

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA



**CARACTERIZAÇÃO DA MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA *PROTEIN GENE*
PRODUCT 9.5 (PGP 9.5) EM CÉLULAS ASTROCITÁRIAS**

Ana Raquel Vicente Dias

Curso de Mestrado em Neurociências

Lisboa, 2014

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA



CARACTERIZAÇÃO DA MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA *PROTEIN GENE*
PRODUCT 9.5 (PGP 9.5) EM CÉLULAS ASTROCITÁRIAS

Ana Raquel Vicente Dias

Orientador: Professor José Pimentel, Laboratório de Neuropatologia do Hospital de Santa Maria (CHLN, EPE)

Co-Orientador: Mestre Pedro Pereira, Laboratório de Neuropatologia do Hospital de Santa Maria (CHLN, EPE)

Todas as afirmações contidas neste trabalho são da exclusiva responsabilidade do candidato, não cabendo à Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa qualquer responsabilidade.

Curso de Mestrado em Neurociências

Lisboa, 2014

Esta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa em reunião de 16 de Dezembro de 2014.

Resumo

A *protein gene product 9.5* (PGP 9.5), também conhecida como *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1* (UCH-L1), é uma proteína citosólica, identificada como uma proteína neuronal específica das células neuronais. A sua presença tem sido verificada em vários outros tipos celulares, incluindo células astrocitárias malignas. Desta forma, pretende-se com o presente trabalho caracterizar a marcação imunohistoquímica desta proteína em células astrocitárias normais, reativas e tumorais.

A amostra de estudo foi constituída por 47 astrocitomas, 10 de grau I, 13 de grau II, 13 de grau III e 11 de grau IV, e delinearam-se três zonas: normal (ZN), de transição (ZT), limítrofe à região tumoral, e tumoral (T). Os casos controlo, num total de 30, corresponderam a um número igual de schwannomas, de casos de cirurgia da epilepsia e de metástases cerebrais. Foi aplicada a técnica imunohistoquímica com os anticorpos primários anti-PGP 9.5, anti-GFAP (filamento intermediário das células astrocitárias) e anti-NeuN (proteína neuronal).

A marcação da PGP andou a par com a marcação de NeuN, e, em contraste com a de GFAP, aumentou, em todas as zonas consideradas, proporcionalmente com o grau de anaplasia tumoral, e diminuiu da ZN para T. Estas diferenças foram mais acentuadas entre os graus I e II, e, no caso da PGP, na ZT. Sete casos marcaram, inclusive, gliofilamentos e outros elementos de natureza glial pela PGP, assim como elementos estromais do tumor.

A sobre-expressão da PGP sugere uma possível função da mesma na supressão ou progressão tumorais, ou, um papel, quer nas células gliais normais durante o desenvolvimento cerebral, quer na gliose reativa ou na tumorigénese da linhagem glial. Este estudo, e outros no futuro, poderão ser importantes para o diagnóstico de neoplasias gliais, neuronais ou mistas.

Palavras Chave: PGP 9.5, imunohistoquímica, astrocitomas, tecido glial

Abstract

Protein gene product 9.5 (PGP 9.5), also known as *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1* (UCH-L1), is a cytosolic protein, identified as a neuron-specific protein. Its presence has been registered in various others cell types, including malignant astrocytic cells. Therefore, the objective of the present work is to characterize the immunohistochemical labelling of this protein in normal, reactive and tumour cells.

The study included 47 astrocytomas, 10 of which were grade I, 13 were grade II, 13 were grade III and 11 were grade IV, and three areas were outlined: normal (ZN), transition (ZT), neighbouring the tumour region, and tumour (T). The control cases, in a total of 30, corresponded to an equal number of schwannomas, epilepsy surgery, and brain metastasis. The immunohistochemical technique was applied, using the primary antibodies anti-PGP 9.5, anti-GFAP (astrocytic cells intermediate filament) and anti-NeuN (neuron protein).

The PGP labelling results paired with the ones from NeuN, and opposed those from the GFAP marker, so that, in all the considered areas, it proportionally increased with the tumour-anaplasia grade, and decreased from ZN to T. These differences were more prominent between grades I and II, and in ZT, in PGP's case. Moreover, seven cases extended PGP labelling to gliofilaments, as well as other glial and tumour stromal elements.

The PGP overexpression suggests a possible function of this protein in tumour's suppression or progression, or a role during brain development in glial cells, in reactive gliosis, or in tumorigenesis of the glial lineage. This study, as well as others in the future, can be proved important for the glial, neuronal or mixed tumours diagnosis.

Key words: PGP 9.5, imunohistochemistry, astrocytomas, glial tissue

Índice Geral

| | |
|---|------|
| Resumo..... | iv |
| Abstract | v |
| Índice de Figuras | ix |
| Índice de Tabelas..... | x |
| Índice de Gráficos | xii |
| Abreviaturas | xiii |
| Agradecimentos..... | xv |
| I. Introdução | 1 |
| 1. <i>Protein Gene Product 9.5 (PGP 9.5)</i> | 1 |
| 1.1 Funções da PGP 9.5 | 2 |
| 1.2 Relação entre PGP 9.5 e processos neurodegenerativos..... | 4 |
| 1.3 Papel da PGP 9.5 em Oncologia | 5 |
| 1.4 Localização extra-neuronal da PGP 9.5 | 7 |
| 2 Constituintes celulares do Sistema Nervoso Central e sua origem embrionária | 9 |
| 3 Astrócitos e Gliose Reativa..... | 11 |
| 4 Tumores do Sistema Nervoso Central | 14 |
| 4.1 Base Histológica e Embrionológica dos Tumores do Sistema Nervoso Central | 15 |
| 4.2 Classificação dos Tumores do Sistema Nervoso | 15 |
| 4.3 Tumores Astrocitários..... | 16 |
| 4.3.1 Classificação dos Tumores astrocitários..... | 17 |
| 4.3.2 Astrocitoma Pilocítico | 17 |
| 4.3.3 Astrocitoma Difuso..... | 19 |
| 4.4 Tumores Metastáticos | 23 |
| 4.5 Tumores do Nervo Periférico - schwannomas | 24 |
| 5 Anticorpos primários: anti- <i>Neuronal Nuclei</i> (NeuN) e anti-Proteína Acídica Glial Fibrilhar (GFAP)..... | 25 |
| II. Objetivos..... | 26 |

| | |
|--|----|
| III. Metodologia | 27 |
| 1. Seleção da amostra | 27 |
| 2. Caracterização da amostra..... | 28 |
| 3. Procedimentos laboratoriais | 29 |
| 4. Técnica de Hematoxilina - Eosina | 30 |
| 5. Técnica de Imunohistoquímica | 31 |
| 6. Análise microscópica | 33 |
| 7. Análise Estatística | 34 |
| IV. Resultados | 36 |
| 1. Análise dos astrocitomas | 36 |
| 2. Comparação entre astrocitomas e grupos de controlo..... | 40 |
| 3. Comparação entre os vários graus de anaplasia dos astrocitomas | 42 |
| 4. Comparação individual entre astrocitomas e grupos controlo | 46 |
| 5. Análise dos casos controlo | 47 |
| V. Discussão dos resultados | 49 |
| 1. A marcação dos casos controlos correspondeu ao expectável | 49 |
| 2. Existe semelhança de resultados entre a marcação apresentada por NeuN e PGP 9.5 em astrocitomas..... | 54 |
| 2.1 A marcação de NeuN diminui da zona normal para a zona tumoral nos astrocitomas.. | 54 |
| 2.2 O número de células marcadas por NeuN aumenta proporcionalmente com o grau de malignidade tumoral..... | 55 |
| 2.3 A marcação de PGP apresenta a mesma tendência do NeuN - diminui da zona normal para a zona tumoral, e aumenta com o grau de anaplasia | 57 |
| 3. Existe uma diminuição gradual de expressão de GFAP do grau I ao grau IV tumoral ... | 61 |
| 4. A marcação de GFAP aumenta progressivamente da zona normal para a zona tumoral em todos os graus de malignidade tumoral | 63 |
| 5. As diferenças entre graus de malignidade tumoral, dois a dois, aparentam ser mais estatisticamente significativas na zona normal e de transição, e de grau I para grau II de anaplasia, para os 3 acs | 63 |
| 6. A comparação entre os casos controlos e os astrocitomas, como um todo, revelam um maior número de diferenças não estatisticamente significativas para a zona normal | 65 |

| | |
|--|--------|
| 7. Comparação entre zona normal e casos de epilepsia, zona tumoral e metástases, e entre schwannomas e as três zonas em estudo | 67 |
| VI. Limitações do estudo..... | 69 |
| VII. Conclusão..... | 70 |
| VIII. Apêndices | xvii |
| 1. Apêndice I: Informação clínica dos casos selecionados para o estudo | xvii |
| 2. Apêndice II - Informação acerca dos reagentes utilizados nos procedimentos laboratoriais | xx |
| 3. Apêndice III – Grelha de avaliação IHQ..... | xxi |
| 4. Apêndice IV – Médias aritméticas das avaliações dos dois avaliadores, e avaliação do sistema informático para todos os casos analisados | xxii |
| 5. Apêndice V – Médias ponderadas das avaliações IHQs dos astrocitomas | xxvi |
| 6. Apêndice VI – Médias ponderadas das avaliações IHQs dos astrocitomas, para cada zona e ac | xxvii |
| 7. Apêndice VII – Médias ponderadas das avaliações IHQs dos astrocitomas, para zonas citoplasmática e nuclear | xxvii |
| 8. Apêndice VIII – Valores de significância estatística para astrocitomas vs controlos | xxviii |
| 9. Apêndice IX – Valores de significância estatística para epilepsia vs zona normal dos astrocitomas..... | xxix |
| 10. Apêndice X – Valores de significância estatística para metástases vs zona tumoral dos astrocitomas..... | xxix |
| 11. Apêndice XI – Valores de significância estatística para schwannomas vs astrocitomas | xxx |
| 12. Apêndice XII – Valores de significância estatística para astrocitomas grau III vs grau IV | xxxi |
| 13. Apêndice XIII – Valores de significância estatística para astrocitomas grau II vs grau III | xxxii |
| 14. Apêndice XIV – Valores de significância estatística para controlos vs astrocitomas | xxxiii |
| 15. Apêndice XV – Médias ponderadas das avaliações IHQs dos casos controlo | xxxiv |
| IX. Referências Bibliográficas..... | xxxv |

Índice de Figuras

- **Figura 1:** Exemplos da marcação neuronal da PGP 9.5 pela técnica de Imunohistoquímica Página 2
- **Figura 2:** Representação gráfica dos componentes celulares *major* do córtex normal e substância branca do cérebro..... Página 9
- **Figura 3:** Diferentes gradações de astrogliose reativa com marcação de GFAP pela técnica de Imunohistoquímica Página 12
- **Figura 4:** Topografia dos tumores pilocíticos no SNC..... Página 19
- **Figura 5:** Astrocitoma pilocítico Página 19
- **Figura 6:** Astrocitoma fibrilhar de grau II Página 20
- **Figura 7:** Topografia dos tumores difusos no SNC..... Página 20
- **Figura 8:** Astrocitoma anaplásico Página 21
- **Figura 9:** Glioblastoma Página 22
- **Figura 10:** Tumores metastáticos Página 23
- **Figura 11:** Marcação IHQ dos casos de astrocitomas Página 38
- **Figura 12:** Marcação IHQ dos casos de astrocitomas Página 39
- **Figura 13:** Marcação IHQ dos casos de epilepsia Página 51
- **Figura 14:** Marcação IHQ dos casos de metástases Página 52
- **Figura 15:** Marcação IHQ dos casos de schwannomas Página 53
- **Figura 16:** Marcação IHQ de neurónios engolfados em parênquima tumoral astrocitário Página 55
- **Figura 17:** Marcação IHQ da zona tumoral dos casos de astrocitomas Página 60

Índice de Tabelas

- **Tabela 1:** Terminologia utilizada para os tumores astrocitários..... Página 18
- **Tabela 2:** Informação clínica dos casos selecionados para o estudo..... Página xvii
- **Tabela 3:** Informação acerca dos reagentes utilizados nos procedimentos laboratoriais
..... Página xx
- **Tabela 4:** Grelha de avaliação IHQ Página xxi
- **Tabela 5:** Médias aritméticas das avaliações dos dois avaliadores, e avaliação do
sistema informático para todos os casos analisados Página xxii
- **Tabela 6:** Médias aritméticas das avaliações IHQs dos astrocitomas Página xxvi
- **Tabela 7:** Médias ponderadas das avaliações IHQs dos astrocitomas, para cada zona e
ac Página xxvii
- **Tabela 8:** Médias ponderadas das avaliações IHQs dos astrocitomas, para zonas
citoplasmática e nuclear Página xxvii
- **Tabela 9:** Valores de significância estatística para astrocitomas vs controles
..... Página xxviii
- **Tabela 10:** Valores de significância estatística para epilepsia vs zona normal dos
astrocitomas Página xxix
- **Tabela 11:** Valores de significância estatística para metástases vs zona tumoral dos
astrocitomas Página xxix
- **Tabela 12:** Valores de significância estatística para schwannomas vs astrocitomas
..... Página xxx
- **Tabela 13:** Valores de significância estatística para astrocitomas grau I vs grau II
..... Página 43

- **Tabela 14:** Valores de significância estatística para astrocitomas grau III vs grau IV (NeuN) Página 44
- **Tabela 15:** Valores de significância estatística para astrocitomas grau III vs grau IV Página xxxi
- **Tabela 16:** Valores de significância estatística para astrocitomas grau I vs grau III Página 44
- **Tabela 17:** Valores de significância estatística para astrocitomas grau I vs grau IV..... Página 45
- **Tabela 18:** Valores de significância estatística para astrocitomas grau II vs grau III (PGP) Página 45
- **Tabela 19:**Valores de significância estatística para astrocitomas grau II vs grau III Página xxxii
- **Tabela 20:** Valores de significância estatística para astrocitomas grau II vs grau IV Página 46
- **Tabela 21:** Valores de significância estatística para controlos vs astrocitomas Página xxxiii
- **Tabela 22:** Médias ponderadas das avaliações IHQs dos controlos Página xxxiv
- **Tabela 23:** Informação clínica dos casos com marcação de PGP 9.5 em células astrocitárias tumorais Página 58

Índice de Gráficos

- **Gráfico 1:** Média aritmética das avaliações IHQs dos astrocitomas, para cada anticorpo Página 37
- **Gráfico 2:** Média aritmética das avaliações IHQs dos astrocitomas, para cada zona e anticorpo Página 37
- **Gráfico 3:** Valores de significância estatística para astrocitomas vs controles Página 40
- **Gráfico 4:** Valores de significância estatística para epilepsia vs zona normal dos astrocitomas Página 41
- **Gráfico 5:** Valores de significância estatística para metástases vs zona tumoral dos astrocitomas Página 41
- **Gráfico 6:** Valores de significância estatística para schwannomas vs astrocitomas Página 42
- **Gráfico 7:** Valores de significância estatística para controles vs astrocitomas Página 47
- **Gráfico 8:** Média ponderada das avaliações IHQs dos casos controle, para cada ac Página 48

Abreviaturas

- PGP 9.5 - *Protein Gene Product 9.5*
- UCH-L1 - Hidrolase do Terminal Carboxil da Ubiquitina L1 (*Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase L1*)
- IHQ – Imunohistoquímico(a)
- SN – Sistema Nervoso
- DUB - Enzima Desubiquitinadora (*Deubiquitinating Enzyme*)
- NCAM – Molécula de Adesão Celular Neural (*Neural Cell Adhesion Molecule*)
- LCR – Líquido Céfalo-Raquidiano
- SNC – Sistema Nervoso Central
- CpG - Citosina-fosfato-Guanina
- SNP - Sistema Nervoso Periférico
- SNA – Sistema Nervoso Autônomo
- GFAP – Proteína Glial Fibrilhar Ácida (*Glial Fibrillary acidic protein*)
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- HE – Hematoxilina-Eosina
- Acs – anticorpos
- Ac – anticorpo
- Neu N - *Neuronal Nuclei*
- GFAP/N/N – GFAP Nuclear Normal
- GFAP/N/ZT – GFAP Nuclear Zona de Transição
- GFAP/N/T – GFAP Nuclear Tumoral
- GFAP/C/N – GFAP Citoplasmática Normal
- GFAP/C/ZT – GFAP Citoplasmática Zona de Transição

- GFAP/C/T – GFAP Citoplasmática Tumoral
- GFAP/N/comp – GFAP Normal computador
- GFAP/ZT/comp – GFAP Zona de Transição computador
- GFAP/T/comp – GFAP Tumoral computador
- NeuN/N/N – NeuN Nuclear Normal
- NeuN/N/ZT – NeuN Nuclear Zona de Transição
- NeuN/N/T – NeuN Nuclear Tumoral
- NeuN/C/N – NeuN Citoplasmática Normal
- NeuN/C/ZT – NeuN Citoplasmática Zona de Transição
- NeuN/C/T – NeuN Citoplasmática Tumoral
- NeuN/N/comp – NeuN Normal computador
- NeuN/ZT/comp – NeuN Zona de Transição computador
- NeuN/T/comp – NeuN Tumoral computador
- PGP/N/N – PGP Nuclear Normal
- PGP/N/ZT – PGP Nuclear Zona de Transição
- PGP/N/T – PGP Nuclear Tumoral
- PGP/C/N – PGP Citoplasmática Normal
- PGP/C/ZT – PGP Citoplasmática Zona de Transição
- PGP/C/T – PGP Citoplasmática Tumoral
- PGP/N/comp – PGP Normal computador
- PGP/ZT/comp – PGP Zona de Transição computador
- PGP/T/comp – PGP Tumoral computador

Agradecimentos

Devo agradecer a várias pessoas que, pela sua contribuição, amizade e interesse foram importantes para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, aos meus orientadores, Doutor José Pimentel e Mestre Pedro Pereira, pela oportunidade inigualável de poder dedicar-me à neuropatologia, uma área tão vasta e tão interessante. Agradeço-lhes igualmente pelo incentivo, pela crítica construtiva e estimulante, pelo apoio, disponibilidade e dedicação incansáveis ao longo deste extenso processo. Um enorme obrigada.

Um grande obrigada à Mestre Ana Rita Silvestre, pela importante ajuda e apoio.

Um obrigada especial à colega e amiga Mafalda Girão, pela valiosa ajuda, apoio e compreensão ao longo da elaboração deste trabalho.

À Alexandra Botelho, Cristina Varandas, Patrícia Marçal e Maria João Paulo, cuja dedicação e empenho fizeram com que a minha tarefa ficasse bastante facilitada.

Por fim, deixo o agradecimento mais importante aos meus pais, à minha família e amigos, pelo apoio, paciência e confiança habituais.

Success is not final, failure is not fatal: it is the courage to continue that counts.

Winston Churchill

I. Introdução

1. *Protein Gene Product* 9.5 (PGP 9.5)

A *protein gene product* 9.5 (PGP 9.5), também conhecida como hidrolase do terminal carboxil da ubiquitina L1 (UCH-L1), é uma proteína citosólica com 27 kDa, identificada, em 1981, como uma proteína neuronal específica das células neuronais.^[1,2,3] A terminologia *Protein Gene Product* foi elaborada por Anderson e Anderson (1979), e tem em conta a distância de migração, em centímetros, da proteína num gel de poliacrilamida.^[4,5] Mayer e Wilkinson estudaram, em 1989, as hidrolases do terminal carboxil da ubiquitina, subdivididas em 1, 2 e 3 de acordo com o gradiente salino aplicado na experiência^[6], e foram também os responsáveis pela descoberta da homologia com a PGP 9.5.^[1]

A sequência primária desta proteína é totalmente distinta de qualquer outra conhecida até à data, e encontra-se altamente expressa em neurónios e células neuroendócrinas de vertebrados (Figura 1).^[1] Constitui cerca de 1 a 5% das proteínas solúveis totais, percentagem extremamente elevada tendo em conta a variedade substancial de proteínas neuronais, e a sua presença é independente do tipo de neurotransmissor utilizado pelo neurónio.^[1] Quanto à sua expressão, esta é maioritariamente citoplasmática (constitui cerca de 5 a 10% do total de proteínas citoplasmáticas)^[1,7], sendo que apenas uma pequena proporção no cérebro está fortemente ligada à membrana.^[1]

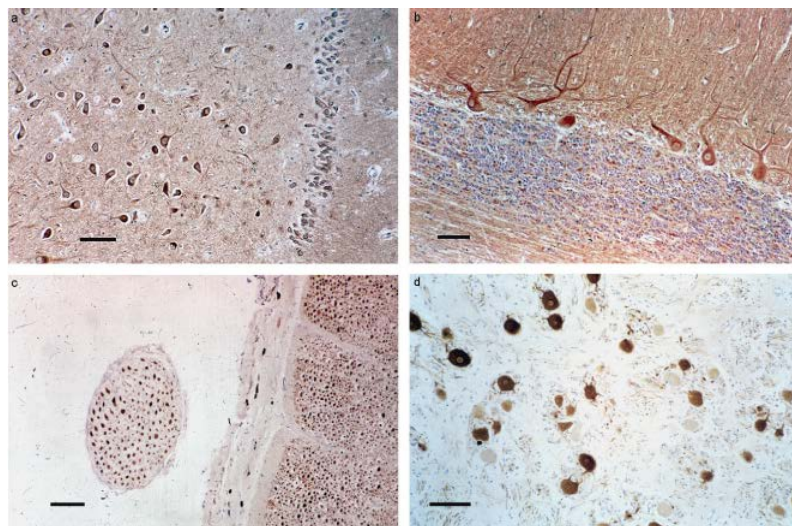


Figura 1 – Exemplos da marcação neuronal da PGP 9.5 pela técnica de imunohistoquímica. a) neurónios piramidais do hipocampo humano; b) células de Purkinje do cerebello humano; c) marcação axonal - raiz raquidiana – corte transversal; d) gânglio trigémio humano.^[1]

1.1 Funções da PGP 9.5

Ao longo das últimas três décadas registou-se um aumento do número de artigos sobre a marcação imunohistoquímica (IHQ) das células neuronais com a PGP 9.5, tanto em tecido humano como animal. Estão abrangidos estudos de re-enervação após transplante hepático ou renal, e de evolução, entre muitos outros, que traduzem a relevância clínica direta desta proteína como marcador neuronal.^[1] As suas possíveis funções nos neurónios constitui um dos temas mais debatidos nestas publicações.

Assim, Osaka *et al*, em 2003, propuseram uma atividade não hidrolítica, que assenta na capacidade desta proteína ligar ubiquitina, funcionando como um estabilizador da monoubiquitina.^[8] Outras funções sugeridas inicialmente abrangem a capacidade de processar a poliubiquitina em monoubiquitina^[1], e ainda uma função ligase, quando a proteína se encontra na sua forma dimerizada.^[9] Mais recentemente, foi verificado que a PGP

9.5 terá como função regular a estabilidade da ubiquitina no sistema nervoso (SN), resultando da sua perda a neurodegeneração de neurónios periféricos e centrais.^[10]

Embora os mecanismos moleculares através dos quais a PGP 9.5 atua permaneçam pouco claros, têm sido variadas as tentativas no sentido de entender o seu mecanismo de interação com a ubiquitina, bem como as suas variadas funções no SN. Deste modo, alguns autores descreveram a UCH-L1 como uma enzima desubiquitinadora (DUB), ou seja, com capacidade de clivar a ligação da ubiquitina ao proteossoma, revertendo o processo de ubiquitinação de proteínas destinadas a proteólise pelo proteossoma.^[11] Esta desubiquitinação é, segundo Wobst *et al*, extensível a uma molécula de adesão celular neural (NCAM), envolvida no desenvolvimento neural e na plasticidade do cérebro adulto. A interação entre a UCH-L1 e as isoformas NCAM 140 e 180 foi demonstrada pela sua co-localização e pelo facto da sobre-expressão da UCH-L1 diminuir a ubiquitinação constitutiva de ambas as isoformas de NCAM, e a sua inibição endógena fazer aumentar a ubiquitinação das mesmas. Conclui-se, portanto, que a UCH-L1 regula a ubiquitinação de ambas as isoformas de NCAM, e, consequentemente, a sua disponibilidade intracelular.^[12]

A PGP 9.5 foi também identificada como um potencial biomarcador no líquido céfalo-raquidiano (LCR) de perda neuronal em hemorragias subaracnoideias aneurismáticas e, possivelmente, de ainda outras patologias do sistema nervoso central (SNC). A UCH-L1 permite, desta forma, revelar detalhes da progressão e localização destas alterações, da possibilidade de recuperação e da eficácia de estratégias neuroprotetoras.^[13] Recentemente, foi ainda notada a sua utilidade na monitorização da disrupção da barreira hemato-encefálica após traumatismo cerebral, podendo funcionar como um possível co-adjuvante, ou até substituto, da proteína S100B, cujas elevações no plasma traduzem fielmente estas alterações.

[14]

Várias outras funções, que não abrangem diretamente o SN, têm sido associadas a esta proteína. O facto de estar altamente expressa no córtex de oócitos mamíferos constitui uma delas, demonstrando-se a sua importância na maturação de oócitos de murinos e macacos Rhesus. ^[11] Bassères *et al* evidenciaram também a capacidade da UCH-L1 promover a invasão de células epiteliais pelas bactérias *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* através da alteração da actina do citoesqueleto. ^[15] O facto da proteína UCH-L1 ser expressa em níveis elevados em células altamente malignas, como as de neuroblastomas ou de carcinoma da próstata, revela-se promissor na área terapêutica, pela susceptibilidade que estas células apresentam a fármacos anti-bacterianos. ^[15]

Já no ano de 2013, Hussain L *et al* evidenciaram o papel regulador-chave desta proteína na sinalização pelo mTOR, uma treonina cinase que regula um grande número de processos celulares. ^[16] Pouco tempo antes, Malvasi *et al* tinham identificado a presença da PGP 9.5 no miométrio e em pseudocápsulas fibrosas, com a capacidade de restabelecer o peristaltismo uterino normal, e, possivelmente, de influenciar positivamente a fertilidade da mulher. ^[17]

1.2 Relação entre PGP 9.5 e processos neurodegenerativos

A função da UCH-L1 relacionada com a ubiquitina sugere, igualmente, um possível papel da mesma em eventos neurodegenerativos, nomeadamente nas doenças de Alzheimer e de Parkinson. Quanto aos estudos incidentes na relação com a doença de Alzheimer, embora em número crescente ao longo dos últimos anos, especialmente na área da genética, eles são ainda diminutos e pouco sustentados, não tendo sido estabelecida uma relação entre a UCH-L1 e os factores de risco para esta doença. Zetterberg *et al* demonstraram que o polimorfismo UCH-L1 S18Y não confere qualquer protecção contra esta doença ^[18], embora Bilguvara *et al*

tenham estabelecido, após mapeamento de indivíduos com doenças neurodegenerativas progressivas precoces, que uma perda recessiva na função da UCH-L1 leva a um início precoce de neurodegeneração. ^[19] Por outro lado, foi proposta uma função de remoção proteolítica dos agregados proteicos que caracterizam esta doença (placas senis e tranças neurofibrilares) por parte do sistema ubiquitina-proteossoma, do qual a UCH-L1 faz parte. Esta ação, aparentemente protetora, foi corroborada pela marcação intensa nos corpos de Lewy, e pela participação da UCH-L1 em eventos moleculares neuronais relevantes para a neurodegeneração. ^[1]

Extensa é a bibliografia dedicada à suscetibilidade ou proteção para a Doença de Parkinson, resultante de mutações no gene UCHL1/PGP 9.5. Na nomenclatura genética atual desta doença, dezoito *loci* cromossómicos foram denominados PARK, de forma a denotar a sua putativa relação com a doença de Parkinson, e numerados de acordo com a ordem cronológica da sua identificação. A UCH-L1 faz parte desta lista, tendo-lhe sido atribuída a designação de PARK5. ^[20] Alguns artigos dão conta de um efeito protetor do polimorfismo S18Y, que possui capacidade hidrolítica aumentada, contra a variante esporádica desta doença ^[18,21], embora dados contraditórios tenham igualmente surgido. ^[18] O mecanismo deste efeito protetor, ainda não totalmente conhecido, pode, no entanto, ser parcialmente explicado pela capacidade anti-oxidante demonstrada em células neuronais que expressam a variante UCH-L1 S18Y. ^[18]

1.3 Papel da PGP 9.5 em Oncologia

A ubiquitinação desempenha um papel fulcral nas modificações pós-traducionais de proteínas e regula, em combinação com a fosforilação e outras alterações pós-traducionais, um elevado número de processos celulares, tais como a diferenciação, proliferação, apoptose

e transformação neoplásica. Como anteriormente referido, o processo de ubiquitinação é controlado pelas DUB. Dado que as células cancerígenas possuem estes processos celulares alterados, foi questionada a ligação entre a expressão de UCH-L1 e a tumorigénese.^[22,23]

Apesar de já ter sido estabelecida uma função putativa, tanto em estudos *in vivo* como *in vitro*, desta proteína para diferentes tipos de tumores, o mecanismo oncogénico a ela subjacente não está clarificado.^[23] Enquanto que a expressão da UCH-L1 está diminuída em casos de leucemia linfática^[24], de carcinoma da mama e do cólon, quando comparada com tecidos controlo^[25,26], em neuroblastomas^[27], bem como em carcinomas do pâncreas^[28] e da próstata, ela está aumentada.^[29] Estas diferenças são habitualmente mediadas por alterações do estado de metilação de DNA do promotor da UCH-L1. Ainda, a hipermetilação de Citosina-fosfato-Guanina (CpG) foi correlacionada com a diminuição ou perda de expressão da UCH-L1 numa grande variedade de tumores.^[30,31] Um dos mais recentes exemplos verificou-se no carcinoma da próstata, onde a metilação da CpG poderá funcionar como um marcador molecular bastante útil na predição clínica de recorrência bioquímica após prostatectomia radical.^[23]

Ao longo dos últimos anos foi ainda reportada uma associação entre a sobre-expressão de UCH-L1 e a progressão, tamanho e invasão tumorais.^[32] No carcinoma da vesícula biliar, a UCH-L1 encontra-se sobre-expressa devido a hipometilação do seu promotor, sendo que a atividade exacerbada do gene se correlaciona com a metastização.^[33] Contrariamente, a hipermetilação do promotor, de que resulta o silenciamento da UCH-L1, foi já reportada na progressão de linhas celulares de carcinoma pavimento-celular, bem como de cancro gástrico e pancreático.^[25,34,35] Estudos mais recentes dão conta de um papel determinante da UCH-L1 na disseminação de carcinoma de pequenas células do pulmão^[36], e uma associação entre esta proteína e a via de sinalização da β Catenina^[37], nomeadamente no cancro colo-rectal.^[38] O

papel da UCH-L1 na patogénese dos melanomas ainda não está clarificado, embora Bonazzi *et al* tenham descrito o silenciamento da proteína por metilação ^[39], e Wülfanger *et al* o tenham relacionado com uma sensibilidade aumentada à apoptose, traduzindo-se num aumento da eficácia terapêutica para estes tumores. ^[40] A proteína UCH-L1 tem ainda a capacidade de interagir com cinases dependentes de ciclinas (CDKs), de uma forma independente das suas funções relacionadas com a ubiquitina, exacerbando a proliferação de células cancerígenas humanas. ^[41]

Mais uma vez devido à metilação do promotor da UCH-L1, esta encontra-se silenciada no carcinoma da nasofaringe, promovendo a sinalização intracelular pelo supressor tumoral p53. ^[42] A hipermetilação do promotor da UCH-L1 traduz-se, igualmente, em casos de cancro esofágico ^[43] e no fluido pancreato-biliar, pelo que poderá revelar-se útil no diagnóstico de cancros pancreático-biliares. ^[44]

Aparentemente, a UCH-L1 poderá, além do seu papel tumorigénico já referido, desempenhar um papel anti-tumorigénico, dependendo do tipo de cancro. De facto, Yu *et al* identificaram esta proteína como um potencial supressor de tumor, impedindo o seu crescimento celular através da inibição da proliferação, indução da apoptose e estabilização da p53. ^[45]

1.4 Localização extra-neuronal da PGP 9.5

Apesar de ser considerada uma proteína específica das células neuronais, a presença da PGP 9.5 tem sido documentada em várias outras estruturas, algumas das quais referidas anteriormente. O sistema neuroendócrino difuso, que inclui o sistema gastroenteropancreático, o sistema neuroendócrino pulmonar e a próstata, constitui um desses exemplos, estando também abrangidos os sistemas reprodutores feminino e masculino

(espermátogonia, células de Leydig, epidídimo e oócitos). No entanto, no primeiro caso, possivelmente devido a diferentes sensibilidades a fixadores, ou à presença de menor concentração desta proteína em células neuroendócrinas difusas, comparativamente às elevadas concentrações em células neuronais, a reação IHQ é menos intensa.^[1] Campbell et al^[7] demonstraram, ainda, marcação IHQ numa plétora de neoplasias mesenquimatosas, tendo sido também demarcada a sua utilidade na deteção de pequenas fibras nervosas em tecidos periféricos de muitas espécies de vertebrados, facto espectável, tendo em conta a sua marcação neuronal específica.^[1]

A par dos inúmeros trabalhos relativos à marcação neuronal desta proteína, estão também reportados casos de marcação em schwannomas^[46,47] e dois de marcação em astrocitomas (não foi possível aceder ao texto original, mas foi referenciado no artigo de Day and Thompson^[1])^[46,48], constatação algo surpreendente tendo em conta os pressupostos acima referidos. Já em 1991, Giambanco *et al*^[49] referiam que, de acordo com estudos em linhas celulares de glioma, esta proteína estaria expressa de forma máxima durante a fase de crescimento, e poderia desempenhar um papel importante, quer nas células gliais normais durante o desenvolvimento cerebral, quer na gliose reativa ou na tumorigénese da linhagem glial.

Ao longo dos últimos anos, o Laboratório de Neuropatologia (LN) do Hospital de Santa Maria (CHLN), na sua rotina de diagnóstico de tumores cerebrais, tem verificado a marcação desta proteína, não só em tecido neuronal, normal ou neoplásico, como seria expectável, mas também numa quantidade relevante de tumores de linhagem glial, daí a pertinência do presente trabalho.

2 Constituintes celulares do Sistema Nervoso Central e sua origem embrionária

O SNC é composto por vários tipos celulares, representados na figura 2. Pelo facto dos astrócitos e dos tumores deles derivados, os astrocitomas, tumores primários mais comuns no SNC, serem um dos assuntos principais deste trabalho, serão posteriormente descritos com maior detalhe.

Embriologicamente, salientam-se duas estruturas importantes para a formação do SN, ambas originárias da placa neural: o tubo neural, que se diferencia no SNC, e a crista neural, que está na origem das células precursoras da maior parte do sistema nervoso periférico (SNP) e do sistema nervoso autónomo (SNA). Apesar de terem uma origem embrionária ancestral comum, é geralmente aceite que os neurónios, os astrócitos e os oligodendrócitos diferenciam-se a partir de duas linhagens distintas. Os primeiros derivam de células progenitoras neuronais, com origem na zona ventricular da neuroectoderme, e as células progenitoras gliais e a glia radial, estrutura associada à migração neuronal no tubo neural, estão, por sua vez, na origem dos astrócitos e oligodendrócitos. [51,52,53]

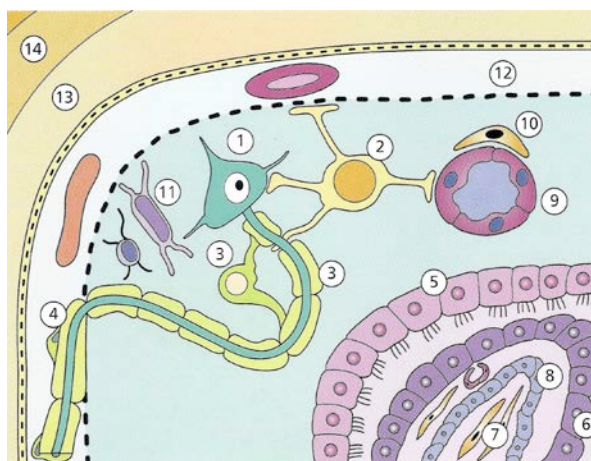


Figura 2 – Representação gráfica dos componentes celulares *major* do córtex normal e substância branca do cérebro. Os revestimentos ósseos e das meninges estão também representados. 1 – neurónio; 2 – astrócitos; 3 –

oligodendrócitos e bainha de mielina; 4 – células de Schwann; 5 – epêndima a cobrir os ventrículos; 6 – epitélio dos plexos coróideus; 7 – células meníngeas no estroma dos plexos coróideus; 8 – vasos sanguíneos dos plexos coróideus; 9 – vasos sanguíneos do córtex e substância branca; 10 – células perivasculares – macrófagos residentes nos espaços perivasculares; 11 – microglia – histiócitos residentes do SNC; 12 - espaço subaracnoide; 13 – dura mãe; 14 – crânio. ^[50]

3 Astrócitos e Gliose Reativa

As células da glia são consideradas participantes críticos em todos os aspetos fulcrais do desenvolvimento, função e doença cerebrais.^[54] Os astrócitos constituem as células gliais mais numerosas, devendo o seu nome à forma grosseiramente estrelada dos seus corpos celulares. Em culturas celulares, são distinguíveis dois padrões de desenvolvimento distintos, tipo 1 e 2, sendo que os astrócitos presentes na substância cinzenta diferenciam-se preferencialmente a partir das células de tipo 1, e os astrócitos fibrosos e oligodendrócitos, presentes na substância branca, a partir das de tipo 2.^[50]

No SNC adulto, existem tipos especializados de astrócitos, tais como os tanícitos e a glia Bergmann, embora a maioria dos astrócitos seja dividida em astrócitos protoplasmáticos, presentes na substância cinzenta, e astrócitos fibrosos, ou fibrilhares, na substância branca.^[50,54] Os astrócitos protoplasmáticos contêm uma pequena quantidade de filamentos intermediários - Proteína Glial Fibrilhar Ácida (GFAP) - nos seus processos ou corpos celulares, contrariamente aos astrócitos fibrosos, que os contêm em maior quantidade.^[50]

As funções desempenhadas pelos astrócitos no SNC normal são bastante numerosas, tendo sido, ao longo dos últimos anos, alvo de grande interesse. De entre elas, destacam-se a capacidade de produzir fatores neurotróficos, de regular a concentração iónica, osmolaridade e pH, de participar no fenómeno de angiogénese, no suporte metabólico neuronal (através da conversão de glucose em glicogénio e do transporte de glutamato), e ainda na formação e manutenção da barreira hemato-encefálica.^[53]

As células gliais respondem a todo o tipo de insultos ao SNC através de um processo definido como gliose reativa, a qual envolve alterações fenotípicas e proliferação de astrócitos e microglia, maioritariamente. Grande parte das reações iniciadas por insultos

agudos progridem rapidamente para hipertrofia e proliferação astrocitárias (figura 3), bem como para produção aumentada de GFAP, tanto nos astrócitos protoplasmáticos como nos fibrosos. ^[50,53] Os astrócitos reativos típicos demarcam-se pelo aumento e excentricidade nucleares, e pelo aumento notório do tamanho dos processos celulares, os quais contêm grande quantidade de GFAP. ^[50]

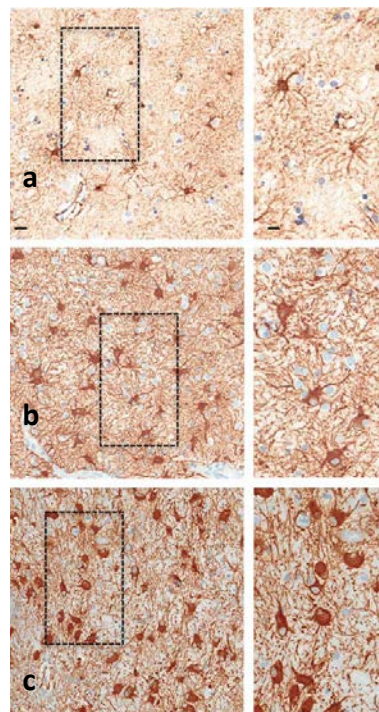


Figura 3 – Diferentes gradações de astrogliose reativa com marcação de GFAP pela técnica de IHQ. a) astrogliose remota em tecido lesado, b) astrogliose reativa moderada, c) astrogliose reativa difusa severa. ^[53]

À medida que a lesão cerebral retrocede, os astrócitos reativos vão diminuindo gradualmente de tamanho, e os processos celulares ficam mais compactos, de forma a formar cicatrizes glióticas densas, como acontece, por exemplo, nas placas glióticas, crónicas, da esclerose múltipla. Num processo mais duradouro de gliose, identificam-se astrócitos binucleados, e algumas células podem apresentar núcleos grandes e hipercromáticos, os quais podem ser confundidos com células neoplásicas. Outra característica dos processos de gliose

prolongada é a presença das fibras de Rosenthal, processos astrocitários intumescidos, contendo ubiquitina, GFAP e α - β Cristalino. Estas fibras podem igualmente estar presentes em astrocitomas pilocíticos.^[50]

4 Tumores do Sistema Nervoso Central

Os tumores do SNC constituem formas comuns de neoplasias malignas, tanto em crianças como em adultos, denotando-se, no entanto, uma discrepância relativamente acentuada entre países desenvolvidos, onde se registam taxas de incidência bastante elevadas, e países em vias de desenvolvimento.^[55] A incidência destes tumores nos países nórdicos, em crianças, revela ser das mais altas no mundo^[56, 57], ao contrário do registado na população infantil Iraniana, bastante mais baixa, sugerindo uma variação étnica e geográfica para a pré-disposição de neoplasias malignas pediátricas no SNC.^[58] Em adolescentes e adultos jovens, com idades compreendidas entre os 15 e os 24 anos, estes tumores constituem já a 4ª forma mais comum de cancro, num total de 14% de todos os tumores diagnosticados nestas idades. Regista-se um novo pico de incidência entre os 55 e os 59 anos, altura a partir da qual os homens apresentam uma percentagem bastante maior de incidência comparativamente às mulheres.^[56] A realidade norte-americana espelha os dados epidemiológicos já referidos.^[59]

Podendo estender-se ao encéfalo e à medula espinhal, o aparecimento de tumores do SNC é caracterizado, entre outras, pela presença de sinais neurológicos focais e/ou pressão intracraniana elevada. Apesar de, hoje em dia, estarem disponíveis tratamentos oncológicos eficazes, alguns dos tumores mais comuns do SNC, nomeadamente os glioblastomas, estão associados a um mau prognóstico e o tratamento é limitadamente eficaz.^[50]

A compreensão da patologia destes tumores reveste-se de extrema importância na gestão dos doentes e na investigação, tanto clínica quanto biológica. Paralelamente aos avanços que pautam as técnicas imagiológicas e cirúrgicas, as metodologias histológicas e de genética molecular aplicadas ao estudo e diagnóstico de tumores do SNC têm sido alvo de um desenvolvimento assinalável. O diagnóstico final destes tumores assenta, de facto, ainda em

grande parte, na avaliação histológica do tecido recolhido cirurgicamente, tanto por peças de exereses, como por biópsia, a qual é ainda considerada o *gold standard*. Dada a sua utilidade na definição da histogénese do tumor, a técnica IHQ tem sido extensamente aplicada, substituindo as antigas colorações de prata para o diagnóstico tecidual. ^[50]

4.1 Base Histológica e Embriológica dos Tumores do Sistema Nervoso Central

A tumorigénese consiste num processo multi-etápico no qual as células se imortalizam, proliferam, invadem e modulam o seu ambiente. Ao longo dos últimos anos, vários estudos nas áreas da biologia molecular e genética têm ajudado a entender melhor os mecanismos subjacentes, não só à formação do tumor, mas também à sua progressão. ^[50,52,60]

As células de origem da maioria dos tumores cerebrais permanece igualmente um tema a debate. No entanto, investigações moleculares sugerem que as mais provavelmente envolvidas serão as células estaminais multipotenciais, que residem, tanto no cérebro em desenvolvimento, como no cérebro adulto. No caso dos astrocitomas, à medida que aumenta a desdiferenciação e anaplasia celulares, as características astrocitárias vão-se tornando cada vez mais diminutas, pelo que a marcação com GFAP se reveste de extrema importância na identificação destas células. ^[50]

4.2 Classificação dos Tumores do Sistema Nervoso

A descrição dos tumores que afetam o encéfalo e a medula espinhal iniciou-se no século XIX, embora a classificação primeiramente utilizada tenha sido formulada por Bailey e Cushing, em 1926. Atualmente, é aplicada a classificação histológica de tumores da Organização Mundial de Saúde (OMS). Esta teve a sua primeira publicação em 1979, tendo sido continuamente revista, e a sua última publicação remonta a 2007. Ela pressupõe a divisão

dos tumores do SN em tumores do tecido neuroepitelial, onde se incluem os tumores astrocitários; os tumores dos nervos cranianos e para-espinhais, onde estão incluídos os schwannomas; os tumores das meninges, os linfomas, as neoplasias hematopoiéticas, os tumores de células germinativas e da região selar, e ainda os metastáticos.^[61] Quanto ao seu comportamento biológico, a escala de classificação da OMS faz corresponder o grau I a tumores com o prognóstico mais favorável e o grau IV a tumores com o prognóstico menos favorável, segundo critérios de anaplasia histológica crescentes.^[50] Esta será a classificação utilizada neste trabalho.

Para além dos tumores astrocitários, particularizam-se, de seguida, igualmente as metástases e os schwannomas dado serem também incluídos.

4.3 Tumores Astrocitários

Os tumores de origem neuroepitelial são os tumores primários do SNC, agrupados de forma genérica sob o termo “gliomas”. Os tumores astrocitários podem surgir em praticamente qualquer parte do cérebro ou medula espinhal, sendo que nos adultos verifica-se uma predileção pelos hemisférios cerebrais, e nas crianças pelo cerebelo e tronco cerebral. Pelo facto das suas células tumorais apresentarem semelhança histológica com astrócitos normais ou reativos, na maioria dos casos a presença de finos processos fibrilares expressando GFAP constitui um traço diagnóstico *major*.^[50]

A grande parte infiltra o cérebro de forma difusa, razão pela qual são designados astrocitomas “difusos”. Estes, do ponto de vista de anaplasia histológica, variam entre astrocitomas difusos, bem diferenciados, e astrocitomas anaplásicos e, ainda, glioblastomas. Estudos genéticos sugerem que os astrocitomas difusos frequentemente, senão inevitavelmente, progridem para astrocitomas anaplásicos ou glioblastomas, apesar de uma

determinada proporção destes aparecerem *de novo*. Os astrocitomas pilocíticos são distintos dos anteriormente referidos, estando-lhes associado um prognóstico mais favorável. ^[50]

A importância dos tumores astrocitários para a neuro-oncologia assenta na sua frequência relativamente elevada, comparativamente a outros tumores do SNC, no seu mau prognóstico, em particular dos astrocitomas anaplásicos e glioblastomas, bem como nas eventuais dificuldades do diagnóstico clínico, radiológico e histológico. ^[50]

A sua descrição incidirá, particularmente, nos aspetos histológicos, uma vez estarem particularmente relacionados com os objetivos deste trabalho.

4.3.1 Classificação dos Tumores astrocitários

Os tumores astrocitários estão subdivididos segundo o representado na tabela 1.

| Terminologia baseada na OMS 2007 | Grau de anaplasia |
|--|-------------------|
| Astrocitoma Pilocítico | Grau I |
| Astrocitoma Difuso (fibrilhar, protoplasmático, gemistocístico) | Grau II |
| Astrocitoma Anaplásico | Grau III |
| Glioblastoma | Grau IV |

Tabela 1 - Terminologia utilizada para os tumores astrocitários. ^[61]

4.3.2 Astrocitoma Pilocítico

Apresentando-se com crescimento lento e frequentemente bem definidos, os astrocitomas pilocíticos ocorrem maioritariamente na faixa etária dos vinte anos, e, particularmente, nos nervos ópticos e cerebelo (figura 4). A eles está associado, em regra, um

relativo bom prognóstico já que raramente sofrem transformação maligna, podendo ainda ser tratados de forma efetiva por excisão cirúrgica. O mau prognóstico está associado à localização, por impedir a sua remoção total, como acontece nos astrocitomas pilocíticos do tronco cerebral.^[50]

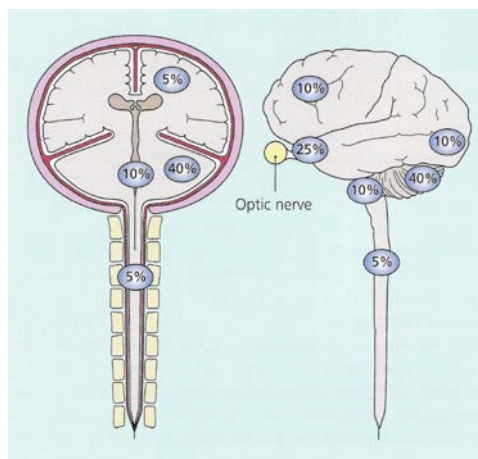


Figura 4 - Topografia dos tumores pilocíticos no SNC.^[50]

Apesar do termo “pilocítico” significar “semelhante a cabelos”, existe uma variação bastante grande da sua morfologia citológica. A maioria apresenta um padrão histológico bifásico (figura 5a), apresentando, com diferentes predominâncias, células pilocíticas longas, bipolares com finos processos terminais, com disposição, quer dispersa, laxa, quer mais densa ou empacotada. A presença das fibras de Rosenthal e dos corpos granulares eosinófilos (partículas proteicas) podem ajudar a delinear o diagnóstico destes tumores. O pleomorfismo nuclear é reduzido, as mitoses raramente são visíveis e o índice proliferativo Ki67/MIB-1 está geralmente um pouco acima de 1%.^[50]

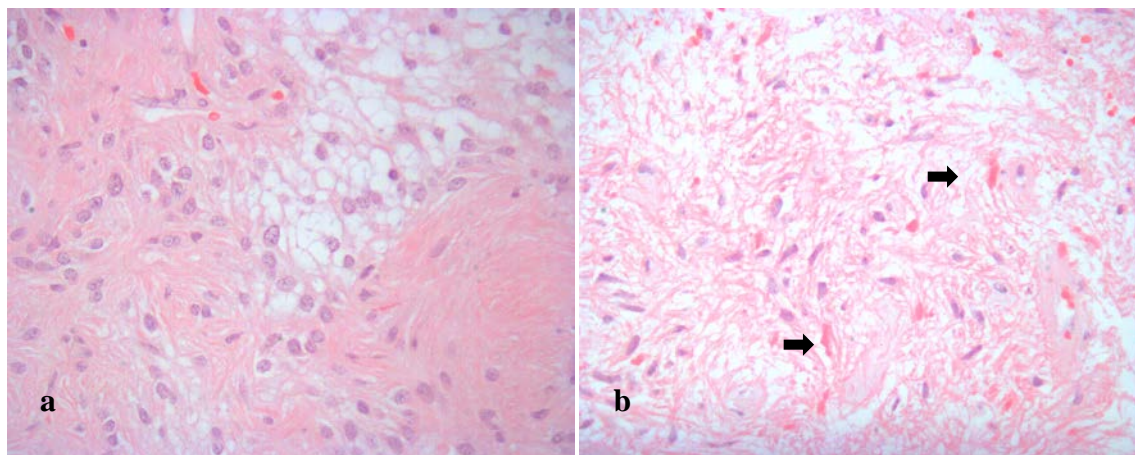


Figura 5 – Astrocitoma pilocítico. A) Observa-se um componente fibrilhar microquístico na porção superior direita da imagem, e um componente pilocítico na restante porção; b) No mesmo caso, identificam-se fibras de Rosenthal (setas a negro). Coloração de Hematoxilina-Eosina (HE). Ampliação de 400x.

4.3.3 Astrocitoma Difuso

Os astrocitomas difusos ou fibrilhares constituem o tipo mais comum de astrocitomas e invadem “difusamente” o parênquima cerebral. O termo fibrilhar remonta à sua morfologia histopatológica, apresentando núcleos astrocitários irregulares e atípicos, num fundo glial fibrilhar. ^[50]

O sistema de estadiamento da OMS define os astrocitomas difusos de grau II como neoplasias caracterizadas por um elevado grau de diferenciação celular, crescimento lento, infiltração difusa das estruturas cerebrais vizinhas e presença de apenas discreto a moderado pleomorfismo e hipercromasia nucleares (figura 6). ^[61] A sua topografia é mais relevante nos hemisférios cerebrais, com predileção para os lobos temporal e frontal de adultos jovens (figura 7). O prognóstico está relacionado com a localização do tumor, sendo a sua remoção cirúrgica radical o factor mais importante. Contudo, devido à sua natureza infiltrativa, raramente é possível proceder à excisão completa. ^[50]

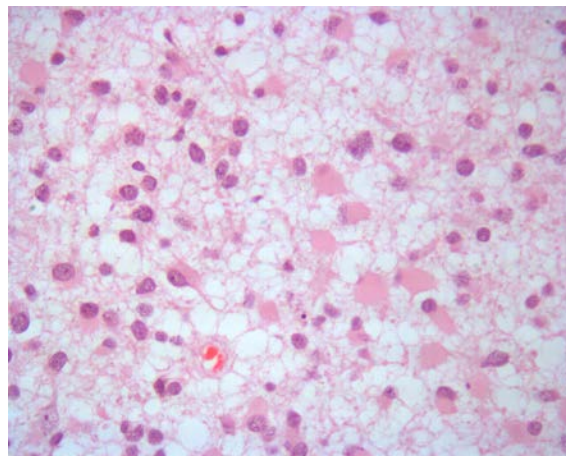


Figura 6 – Astrocitoma fibrilar de grau II. Apenas existência de núcleos ligeiramente hipercromáticos e pleomórficos (HE). Ampliação de 400x.

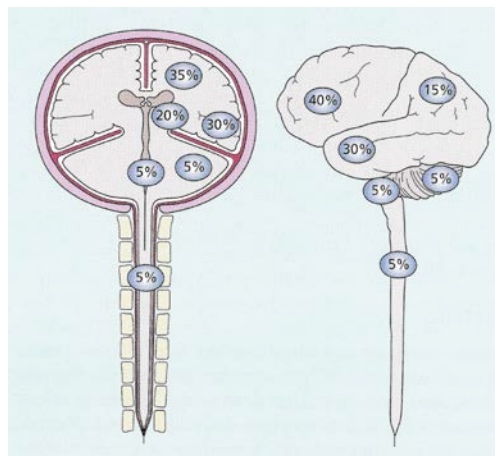


Figura 7 – Topografia dos astrocitomas difusos no SNC. [50]

Quanto às características citológicas, distinguem-se igualmente três padrões *major* nos astrocitomas difusos. Em primeiro lugar, e o mais comum, o astrocitoma fibrilar, com células que se assemelham a astrócitos fibrilares da substância branca, contendo quantidades moderadas de GFAP nos seus processos. Como segundo padrão, os astrocitomas protoplasmáticos, com astrócitos que se assemelham a astrócitos protoplasmáticos, normalmente presentes no córtex cerebral, contendo poucos filamentos intermediários positivos para GFAP nos seus processos. Por último, os astrocitomas gemistocíticos,

compostos por células engorgitadas, relativamente semelhantes a astrócitos reativos, com acumulação globular de citoplasma paranuclear mais acentuada, e um número menor de processos celulares comparativamente aos astrócitos reativos. [50]

4.3.4 Astrocitoma Anaplásico

Os astrocitomas anaplásicos podem, por ventura, ser astrocitomas inicialmente difusos que sofreram alterações anaplásicas. A sua incidência e a idade do início é, em regra, ligeiramente superior à dos astrocitomas de grau II. De forma semelhante a estes, os astrocitomas anaplásicos localizam-se preferencialmente nos hemisférios cerebrais. [50]

O maior grau de anaplasia histológica traduz-se por um pleomorfismo e hipercromasia nucleares mais marcados, aumento da razão núcleo-citoplasma e por um índice mitótico elevado (figura 8). [50]

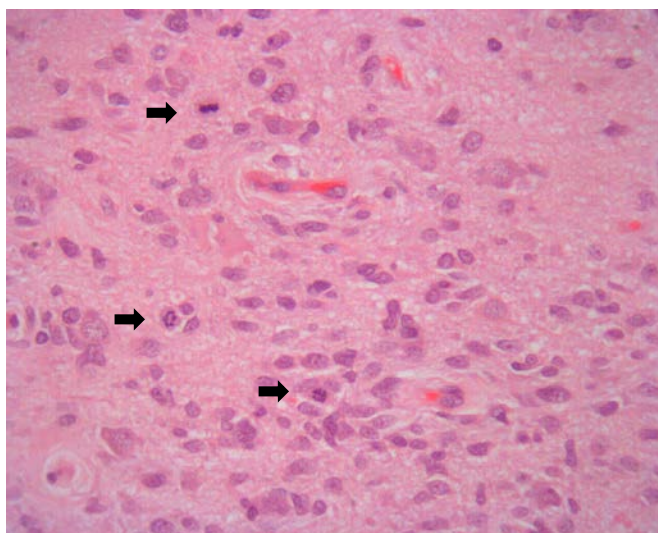


Figura 8 – Astrocitoma anaplásico. Tumor de celularidade aumentada cujos elementos astrocitários são munidos de núcleos medianamente pleomórficos e hipercromáticos e apresentam índice mitótico aumentado (setas a negro). HE. Ampliação de 100x

4.3.5 Glioblastoma

Constitui o tumor intracraniano primário mais comum em adultos. A sua incidência é maior em doentes com mais de 50 anos, com uma ligeira predominância masculina. Os hemisférios cerebrais constituem, mais uma vez, os locais preferenciais da sua incidência. Ocasionalmente, disseminam através do sistema ventricular e metastizam longe do local da origem. Mais raramente ainda, podem metastizar fora do SNC. A maior parte dos estudos clínicos sugere uma média de sobrevivência destes doentes inferior a um ano. [50]

Citologicamente, é grande a variabilidade das células tumorais, sendo que o glioblastoma de células gigantes e o gliosarcoma constituem algumas das suas variantes. Para além do grande pleomorfismo e hipercromasia nucleares, bem como baixa diferenciação dos astrócitos neoplásicos, são facilmente identificáveis figuras mitóticas, incluindo formas altamente atípicas, e alterações da microvascularização tumoral (figura 9). Extensas áreas de necrose rodeadas por regiões em pseudo-paliçada, são igualmente características destes tumores. [50]

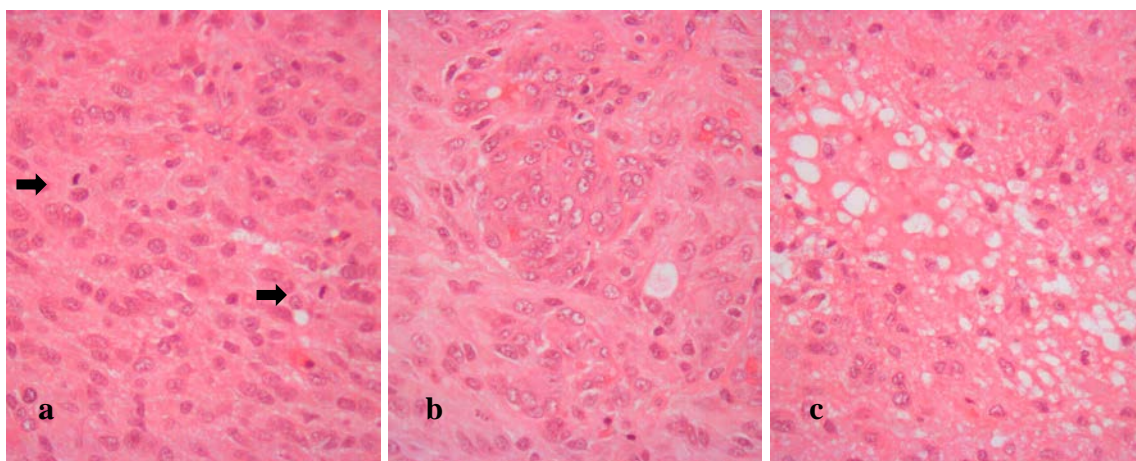


Figura 9 – Glioblastoma. A) índice mitótico aumentado (seta a negro); b) alterações da microvascularização tumoral com proliferação endotelial (ao centro). Notar também moderada hipercromasia e polimorfismo nuclear dos elementos neoplásicos; c) presença de necrose. HE. Ampliação 400x.

4.4 Tumores Metastáticos

O SNC e os seus revestimentos constituem locais frequentes de metastização de tumores sistémicos. De facto, os tumores metastáticos são uma categoria frequente de neoplasias envolvendo o SNC, com predileção pelos hemisférios cerebrais e cerebelo. No homem, o tumor que mais metastiza é o carcinoma do pulmão e colo-rectal, e na mulher o da mama e do pulmão. ^[60]

As características histológicas, citológicas e IHQs destes tumores refletem, em regra, os tumores primários dos quais são originários, embora o grau de diferenciação possa não ser igual. Habitualmente a demarcação do parênquima cerebral circundante é bem definida, e estão extensamente necrosados (figura 10 a e b). ^[55]

Quanto ao papel da IHQ, esta reveste-se, atualmente, de extrema importância para a avaliação da maturação celular, permitindo uma categorização precisa da maioria dos tumores metastáticos do SNC. Nos casos em que o tumor primário está oculto, é utilizado um painel de anticorpos (acs) de forma a classificar convenientemente a sua origem. ^[55]

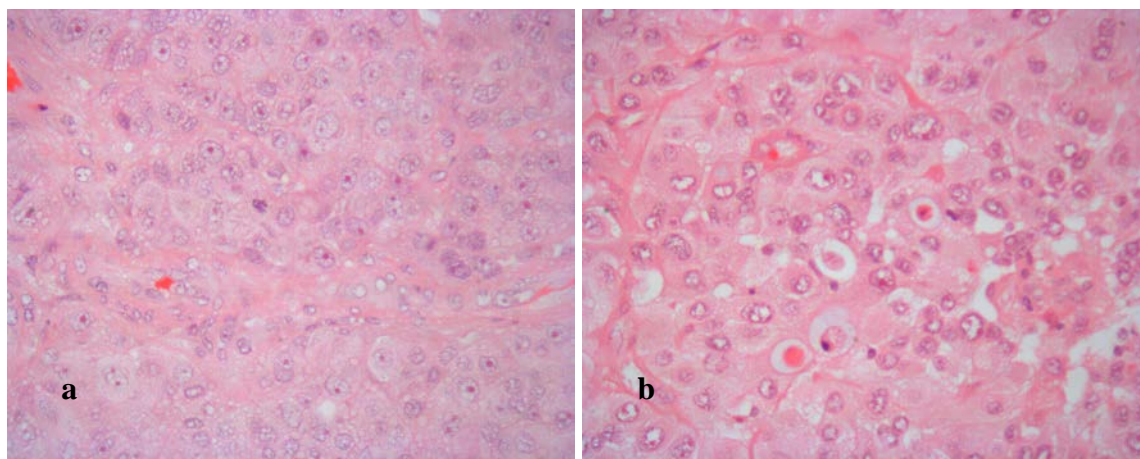


Figura 10 – Tumores metastáticos. a) adenocarcinoma do pulmão. b) carcinoma da mama. Ampliação 400x. HE
^[50]

4.5 Tumores do Nervo Periférico - schwannomas

Os schwannomas, também denominados como neurilemomas ou neurinomas, integram os tumores dos nervos periféricos, e possuem uma origem embrionária distinta dos astrocitomas. São, em geral, benignos e compostos por células de Schwann maduras. De uma forma geral, são tumores solitários e esporádicos, embora existam associações sindrômicas, nomeadamente com a neurofibromatose II (NF2) e schwannomatose, entre outros. Podem diferenciar-se 4 tipos histológicos de Schwannomas: convencional, celular, plexiforme e melanocítico.^[61] O tipo convencional é, sem dúvida, o mais comum.^[50]

Ocorrem em qualquer idade, embora revelem um pico de incidência entre a quarta e sexta décadas de vida. Quanto à sua localização anatómica, surgem mais frequentemente, quer no nervo acústico, podendo ocupar o ângulo ponto-cerebeloso, quer nas raízes posteriores dos nervos raquidianos.^[50]

Histologicamente, são distinguíveis dois padrões de organização celular: áreas compactas, onde as células estão dispostas em feixes e paliçadas (Antoni A), e os núcleos são geralmente alongados; e áreas laxas, onde os elementos se dispõem livremente, formando uma malha de rede fina (Antoni B). Imunohistoquimicamente, os schwannomas são habitual e uniformemente reativos à proteína S-100. As proteínas GFAP e CD68 podem ser detetadas em alguns tumores.^[50]

5 Anticorpos primários: anti-*Neuronal Nuclei* (NeuN) e anti-Proteína Acídica Glial Fibrilhar (GFAP)

No decorrer do presente estudo, foram aplicados, para além do anticorpo (ac) anti-PGP 9.5, um astrocitário, anti-GFAP e ainda um neuronal, anti-NeuN, seleção que teve em conta a especificidade da sua marcação, a frequência de utilização em trabalhos anteriormente publicados, bem como a disponibilidade dos mesmos no LN.

Neu N (*Neuronal Nuclei*) diz respeito a uma proteína neuronal nuclear específica identificada por imunoreatividade com um ac monoclonal, anti-NeuN, numa grande variedade de espécies, incluindo pássaros, roedores e humanos.^[62,63] Marca exclusivamente células neuronais no SNC (à exceção de inter-neurónios cerebelosos) e no SNP, especialmente neurónios pós-mitóticos, neurónios em diferenciação ou totalmente diferenciados. Algumas exceções foram, no entanto registadas, as quais incluem a medula da supra-renal, onde se verifica igualmente marcação por parte do anti-NeuN.^[62,64] Não existem casos descritos de marcação em células gliais.^[63]

Este ac tem sido referido como uma ferramenta útil na deteção de células neuronais pós-mitóticas, na biologia de desenvolvimento, na investigação de células estaminais e ainda no diagnóstico histopatológico, nomeadamente no caso de malformações do desenvolvimento cortical e tumores neuronais ou mistos.^[63]

O GFAP é um filamento intermediário de classe III extremamente frequente em astrócitos.^[65] Está ainda presente em alguns grupos de oligodendrócitos, células ependimárias e em células de schwann, células satélite e células gliais entéricas no SNP. Desta forma, o ac anti-GFAP, de localização citoplasmática, revela-se particularmente útil na distinção de neoplasias de origem astrocitária de outras do SNC.^[66,67]

II. Objetivos

Tendo em conta a escassez de estudos incidentes na marcação da PGP 9.5 em tecidos gliais, independentemente da sua natureza, bem como a referida constatação anterior no LN da imunoreatividade deste marcador em células astrocitárias de tumores glioneuronais, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar a marcação IHQ desta proteína em células astrocitárias normais, reativas e tumorais, com utilização de microscopia de campo claro.

Cremos que ele poderá contribuir para rever o conceito da especificidade deste marcador e consequente utilização na marcação das células neuronais e respetivos prolongamentos. Este facto poderá ser particularmente relevante no diagnóstico dos tumores do SNC mistos, glioneuronais. Por outro lado, ajudará a ser crítico na sua utilização crescente no estudo das fibras nervosas periféricas de muitas doenças sistémicas.

III. Metodologia

O estudo, realizado no LN do Hospital de Santa Maria (CHLN), e aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde do mesmo hospital, foi retrospectivo e prospetivo, na medida em que se analisaram casos do arquivo, bem como novos, diagnosticados ao longo do período em que o mesmo decorreu. Foram recolhidas as seguintes informações clínicas discriminadas nas requisições de diagnóstico, e apresentadas em apêndice I: a idade e género do doente, localização da neoplasia e origem primária ou metastática da mesma.

1. Seleção da amostra

Para que a amostragem fosse robusta e a caracterização pretendida fidedigna, considerou-se adequado um número de cerca de 10 casos para cada um dos tumores astrocitários dos quatro graus de anaplasia. A escolha inicial teve por base o tamanho da amostra, tendo sido eliminadas todas as biópsias ou peças de tamanho bastante reduzido, exclusão que se estendeu a tumores medulares e do tronco cerebral por possibilidade reduzida de conterem tecido nervoso normal. O mesmo procedimento foi realizado para cada grupo de amostras controlo, seguidamente referidas.

Foram recolhidos os números histológicos dos casos selecionados, bem como as respectivas lâminas histológicas coradas pela HE e os blocos histológicos. Procedeu-se a uma segunda escolha de casos, com base na presença de três zonas que se pretenderam estudar: células astrocitárias normais (Zona Normal, ZN); reativas, nas zonas limítrofes de tecido lesional (Zona de Transição - ZT); e neoplásicas, obtidas no “núcleo” do tumor astrocitário (Zona tumoral - T).

2. Caracterização da amostra

O conjunto de casos e de controlos selecionados corresponderam a doentes operados no Serviço de Neurocirurgia do Hospital de Santa Maria (CHLN), num período compreendido entre Outubro de 1998 e Janeiro de 2013.

Quanto aos casos em estudo, foram selecionados um total de 47 astrocitomas, 10 de grau I, 13 de grau II, 13 de grau III e 11 de grau IV.

Os casos controlo, num total de 30, corresponderam a um número igual de schwannomas, de casos de cirurgia da epilepsia não neoplásica e de metástases de adenocarcinoma do pulmão e da mama (cinco de cada), as mais frequentemente diagnosticadas no LN. Foi ainda levado em conta o próprio controlo interno do tecido, o qual se baseia na análise de componentes celulares pertencentes ao tecido em estudo que apresentam (controlo positivo) ou não (controlo negativo) marcação IHQ, funcionando como um controlo de qualidade da marcação apresentada.

Apesar de, tal como referido anteriormente, já ter sido demonstrada a presença da marcação da PGP 9.5 em schwannomas, achou-se pertinente incluir este tipo tecidular pelo facto de ser originário da crista neural, portanto, de origem distinta dos elementos gliais e neuronais. Os 10 casos controlo de metástases apenas se destinaram à comparação com a T dos casos de astrocitomas, tal como para os casos de cirurgia de epilepsia, utilizados como controlo para a ZN dos mesmos. Relativamente a este último controlo, considerou-se que, apesar de haver tecido patológico nas amostras, este encontra-se, geralmente, afastado do tecido parenquimatoso julgado normal, tornando possível a sua utilização como controlo negativo.

Quanto às características clínicas da amostra dos casos em estudo, a média de idades correspondeu a 44 anos, embora com uma flutuação bastante marcada, entre os 3 e os 82 anos (desvio padrão: 18,44). A média de idades dos astrocitomas de grau I foi de 19 anos (mediana: 15), dos de grau II de 39 anos (mediana: 38), dos de grau III de 41 anos (mediana: 40) e dos glioblastomas de 57 anos (mediana: 60) .

Relativamente às metástases, a média de idades correspondeu a 60 anos (mediana: 61), aos schwannomas a de 54 anos (mediana: 56), e aos casos de epilepsia a de 42 anos (mediana: 39).

Quanto à localização dos tumores, os astrocitomas pilocíticos eram, como seria expectável, maioritariamente cerebelosos, os astrocitomas difusos (grau II) do lobo temporal, e os anaplásicos (grau III) do lobo frontal. Os glioblastomas e ambos os tipos de metástases apresentaram uma grande variabilidade topográfica, enquanto que os casos de cirurgia de epilepsia resultaram de ressecções cirúrgicas do hipocampo (apêndice I).

3. Procedimentos laboratoriais

A técnica histopatológica tem início com o processo da fixação, pelo qual se pretende alterar a estrutura de proteínas, de forma a preservar os tecidos da degradação e de outras modificações. Deve permitir, ainda, a preservação da localização do antigénio e da sua estrutura secundária e terciária para que o ac utilizado na técnica de IHQ o possa identificar. O fixador rotineiramente utilizado é o formol tamponado. A duração deste etapa está dependente do tamanho dos fragmentos histológicos, sendo que, por exemplo, a biópsias, de menores dimensões, corresponderá um período de fixação bastante mais reduzido, comparativamente a peças cirúrgicas.

Prossegue-se de seguida à análise macroscópica do material histológico a estudar, e consequente seleção das zonas mais representativas do mesmo. As amostras são colocadas em cassetes histológicas, seguindo-se o processamento num processador automático vertical. Esta etapa permite, não só fornecer aos fragmentos tecidulares um suporte interno e externo resistente às manipulações futuras, como também, posteriormente, permitir a visualização ao microscópio de campo claro. Os fragmentos deverão passar por um processo de desidratação, com banhos sucessivos de concentrações crescentes de álcool (70%, 96% e 100%), diafanização ou clarificação com xilol e, por fim, impregnação em parafina, um meio sólido e firme o suficiente para a obtenção de cortes finos na etapa da microtomia, e ao mesmo tempo macio o suficiente para não danificar a lâmina do micrótomo ou o tecido.

A aplicação da técnica da microtomia constituiu o passo seguinte, tendo sido obtidos, a partir de cada bloco histológico, seis cortes de 3 μ m em micrótomo de Minot, espessura *standard* para a técnica de HE e IHQ. Dois deles foram cortados apenas como reserva. Após adesão de cada um dos cortes, isoladamente, a lâminas adesivadas *Superfrost® Plus*, estas foram colocadas em estufa durante duas horas a uma temperatura de 60°C, por forma a promover a adesão completa dos cortes às mesmas.

4. Técnica de Hematoxilina - Eosina

A etapa da coloração histológica ou histopatológica advém do facto dos cortes histológicos serem translúcidos, pelo que é necessário dar contraste e enfatizar a presença de determinadas estruturas. Esta técnica inicia-se com um processo de desparafinação através da imersão das lâminas histológicas numa solução de xilol durante 10 minutos, seguida de hidratação com concentrações decrescentes de álcool (100%, 96% e 70%). Os núcleos são seguidamente corados de violeta através da coloração com Hematoxilina de Harris (Merck).

O excesso deste corante básico é seguidamente retirado com a emersão das lâminas em ácido clorídrico a 1%, e a coloração azul dos núcleos obtida através da aplicação de água amoniacal. O contraste citoplasmático e dos componentes extracelulares é levado a cabo pela Eosina (Merck), um corante ácido que atribui uma coloração variável entre rosa e laranja às referidas estruturas. A técnica é finalizada com um processo de desidratação novamente com álcool (70%, 96% e três passagens com álcool a 100%), passagem em xilol e posterior montagem da lamela com *Entellan*[®].

5. Técnica de Imunohistoquímica

A aplicabilidade prática da IHQ advém da possibilidade de conjugação de um marcador, o qual possibilita a visualização da marcação, com um ac, outra proteína ou composto, sem danificar a ligação específica antígeno-ac. Esta técnica tem o início em tudo semelhante à técnica de HE, com desparafinação numa solução de xilol, durante 10 minutos, seguindo-se a mesma hidratação alcoólica.

A inibição da peroxidase endógena, possível propiciadora de marcação inespecífica, constituiu a etapa seguinte, tendo sido utilizada para o efeito uma solução de peróxido de hidrogénio a 3% (Merck) em água destilada durante 15 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram de seguida lavadas com água destilada e emersas numa solução de tampão citrato (solução comercial *Vector H3300*), num processo designado por recuperação antigénica. Para tal são necessárias temperaturas elevadas, tendo sido colocadas as lâminas no microondas a uma potência de 600W durante 10 minutos, seguidos de 20 minutos a 850W. Esta etapa tem como objetivo recuperar os epítomos antigénicos que, após o processo de fixação e inclusão, poderão ter sido “mascarados”, favorecendo a ligação antígeno-ac.

A incubação dos acs primários constituiu a etapa seguinte, tendo sido utilizados os acs anti-PGP 9.5 (AbD Serotec, clone 10A1), anti-NeuN (Millipore, clone A60) e anti-GFAP (Cell Marque, clone G-A-5), em diluições de 1:40, 1:40 e 1:200, respetivamente. Para tal, foram utilizados três cortes histológicos para cada caso em estudo, correspondentes ao número de acs a aplicar, e as lâminas primeiramente lavadas com tampão fosfato salino (PBS). Foi utilizada a solução de diluição soro de albumina bovino (BSA) a 1%, e preparados 200 µL de ac para cada lâmina. Esta etapa teve a duração de uma hora à temperatura ambiente e o auxílio da tecnologia *Sequenza*[®].

Seguiram-se duas lavagens de 5 minutos com tampão PBS e a aplicação do polímero indireto *EnVision*[®] da *Dako*[®], durante 1 hora à temperatura ambiente. Este baseia-se num método de detecção indireto constituído por um polímero ao qual estão acoplados acs secundários (com Imunoglobulinas anti-ratinho e anti-coelho) e moléculas propiciadoras da visualização, neste caso a Peroxidase de Rábano (HRP), e tendo como cromogénio o DAB (3,3 – *Diamobenzidina Tetrahydrochloride*), o qual gera um precipitado castanho. Antes da aplicação do DAB, a qual demora 5 minutos, são realizadas duas novas lavagens de 5 minutos com PBS e, posteriormente, feito contraste com Hematoxilina de Harris (Merck) durante cerca de 5 segundos, e passagem por água corrente de forma a “azular”.

A técnica IHQ termina com desidratação dos tecidos com concentrações crescentes de álcool (70%, 96% e 100%), passagem pelo xilol e montagem com *Entellan*[®]. Todas as lâminas foram, por fim, visualizadas ao microscópio de *Bright Field* como forma de controlo da aplicação da técnica.

Todos os protocolos explicitados foram otimizados ao longo do tempo no LN e padronizados para todas as lâminas histológicas em estudo, e toda a técnica IHQ foi realizada

pela autora do presente trabalho. As características dos reagentes utilizados no decurso dos processos laboratoriais referidos encontram-se devidamente discriminados em apêndice II.

6. Análise microscópica

Por forma a proceder-se à análise microscópica das lâminas histológicas em estudo, começou-se por marcar as três zonas de interesse, ZN, ZT e T, tendo como referência as lâminas histológicas de HE dos respetivos casos. A avaliação microscópica foi seguidamente realizada por 3 avaliadores distintos, de forma isolada, com o intuito de tornar os resultados fidedignos e reprodutíveis. Em duas dessas avaliações, quantificou-se a qualidade da marcação IHQ em cada uma das zonas de cada um dos casos com recurso a uma grelha de avaliação que permitia atribuir uma pontuação de 0 a 4 pontos aos parâmetros marcação nuclear e citoplasmática (apêndice III). A escala utilizada consistiu numa adaptação à utilizada por Fisher *et al* ^[68], a qual entendemos que permitia avaliar, não só a presença ou ausência de marcação IHQ, como também o número de células, expresso em percentagem, que demonstravam reatividade IHQ positiva, fosse nuclear ou citoplasmática. A escala foi, então, a seguinte:

- **4 (Forte)** - Marcação nuclear/citoplasmática intensa, facilmente visível com uma objectiva de baixa ampliação, e que envolve >50% das células;
- **3 (Moderada)** - Áreas de marcação focal intensa (<50% das células), ou marcação nuclear/citoplasmática moderada de >50% das células;
- **2 (Frac)** - Marcação focal moderada em <50% das células, ou marcação nuclear ténue em qualquer proporção de células não facilmente visível sob baixa ampliação
- **1 (Difusa)** - Marcação nuclear/citoplasmática de células difusamente distribuídas;
- **0 (ausente)** – ausência de qualquer das anteriores.

A 3ª avaliação microscópica foi obtida com recurso ao programa de processamento de imagens *Motic® Images Advanced 3.1*. Todas as fotografias foram obtidas numa resolução de 1280 x 1024 pixels, numa ampliação de 400x e sempre sob a incidência da mesma quantidade de luz. Por forma a tornar a avaliação reprodutível, para os três acs em estudo, foram seleccionadas sempre as mesmas regiões no tecido.

A análise das imagens foi realizada com o programa *ImageJ*, com recurso ao qual foi realizada, após correta padronização da escala, a quantificação da marcação IHQ presente em cada imagem, e, no caso das marcações com NeuN, a contagem do número total de núcleos marcados para cada zona de interesse. Tendo em conta que a quantificação da marcação IHQ era obtida sob a forma de percentagem, e para os resultados poderem ser comparados, realizou-se uma conversão para a escala acima explicitada. Assim, a percentagens compreendida no intervalo [0 - 20%[, foi atribuída a pontuação de 0, no intervalo [20-40%[o valor de 1, no intervalo [40-60%[o de 2, no intervalo [60-80%[o de 3 e no intervalo [80-100%] o de 4.

7. Análise Estatística

Os resultados foram primeiramente introduzidos numa base de dados *Excel®*, transposta seguidamente para o software informático *IBM® SPSS® Statistics 22*, por forma a realizar a respetiva análise estatística. Para a comparação entre as avaliações dos três avaliadores, foram aplicados os testes paramétricos *oneway ANOVA* com post-hoc de Tukey. A comparação entre grupos controlo e tumorais, a qual foi feita dois a dois, teve por base os testes paramétricos *Independent Samples t-Student*, para amostras emparelhadas e independentes. A aplicação dos referidos testes foi precedida pela aplicação do teste de igualdade de variâncias ou de Levene, que assegurou a adequabilidade dos mesmos.

O valor de confiança utilizado foi de 95%, pelo que valores de p inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

Após confirmada a homogeneidade de resultados entre avaliadores, realizou-se a média aritmética das classificações dos dois avaliadores, por forma a facilitar a interpretação dos resultados. A 3ª avaliação microscópica não foi submetida à mesma, já que não discrimina entre marcação nuclear e citoplasmática. Foram ainda realizadas as médias ponderadas dos casos de cada grupo controlo e tumoral, seguida das médias para cada tipo de marcação IHQ, citoplasmática ou nuclear, para cada zona em estudo (N, ZT e T), e, por fim, para cada ac. Estas permitem obter uma percepção global das avaliações obtidas, na escala utilizada.

De referir que, daqui por diante, os acs serão referenciados apenas pelo nome da proteína que marcam (ex: o GFAP, em substituição de o ac anti-GFAP).

IV. Resultados

Ao longo da exposição dos resultados e da discussão, serão utilizadas as abreviaturas do ac utilizado, seguidas da localização celular, núcleo (N) ou citoplasma (C), da marcação IHQ, e da zona em estudo (N, ZT ou T). Como exemplo, PGP/N/N corresponderá à marcação pelo ac anti-GFAP, nuclear, e na zona normal. Caso se trate da avaliação pelo computador (assinalada com “comp”), não será referida a localização já ele não a individualiza. As abreviaturas encontram-se discriminadas na respetiva lista. A base de dados contendo a média aritmética da avaliação dos dois avaliadores e a do sistema informático para todos os casos analisados encontra-se em apêndice IV.

1. Análise dos astrocitomas

Quanto ao astrocitomas (apêndices V, VI e VII), os valores de média ponderada para o GFAP foram inversamente proporcionais ao grau de severidade tumoral, registando-se 3.450 para os de grau I, 3.026 para os de grau II, 2.980 para os de grau III e 2.780 para os de grau IV (gráfico 1). Pelo contrário, os valores para NeuN e PGP 9.5 tenderam a aumentar com o grau de anaplasia tumoral, com uma média de 1.083 (grau I), 1.265 (grau II), 1.266 (grau III) e 2.151 (grau IV) para o ac NeuN, e 1.222 (grau I), 2.167 (grau II), 2.290 (grau III), 2.490 (grau IV) para o ac PGP 9.5 (figura 11).

Quanto analisadas as três zonas em estudo, constatamos que a marcação pelo GFAP tende, de uma forma geral, a aumentar da ZN para a T, para todos os graus tumorais, ao contrário da marcação por NeuN e PGP 9.5, em que se verifica uma tendência para diminuição da sua marcação (gráfico 2 e figura 12).

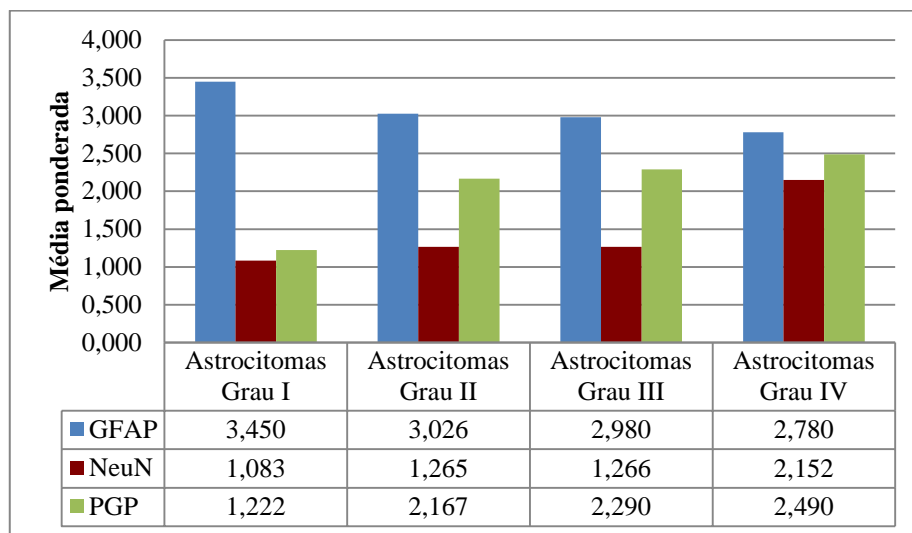


Gráfico 1 – Média ponderada das avaliações IHQs dos astrocitomas, para cada ac.

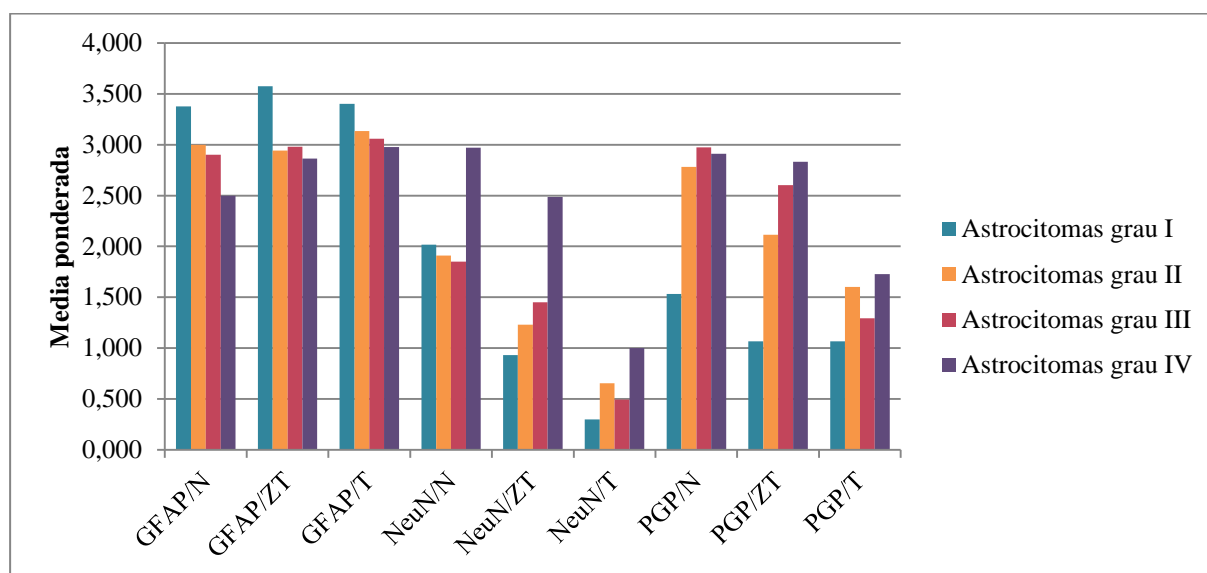


Gráfico 2 – Média ponderada das avaliações IHQs dos astrocitomas, para cada zona e ac.

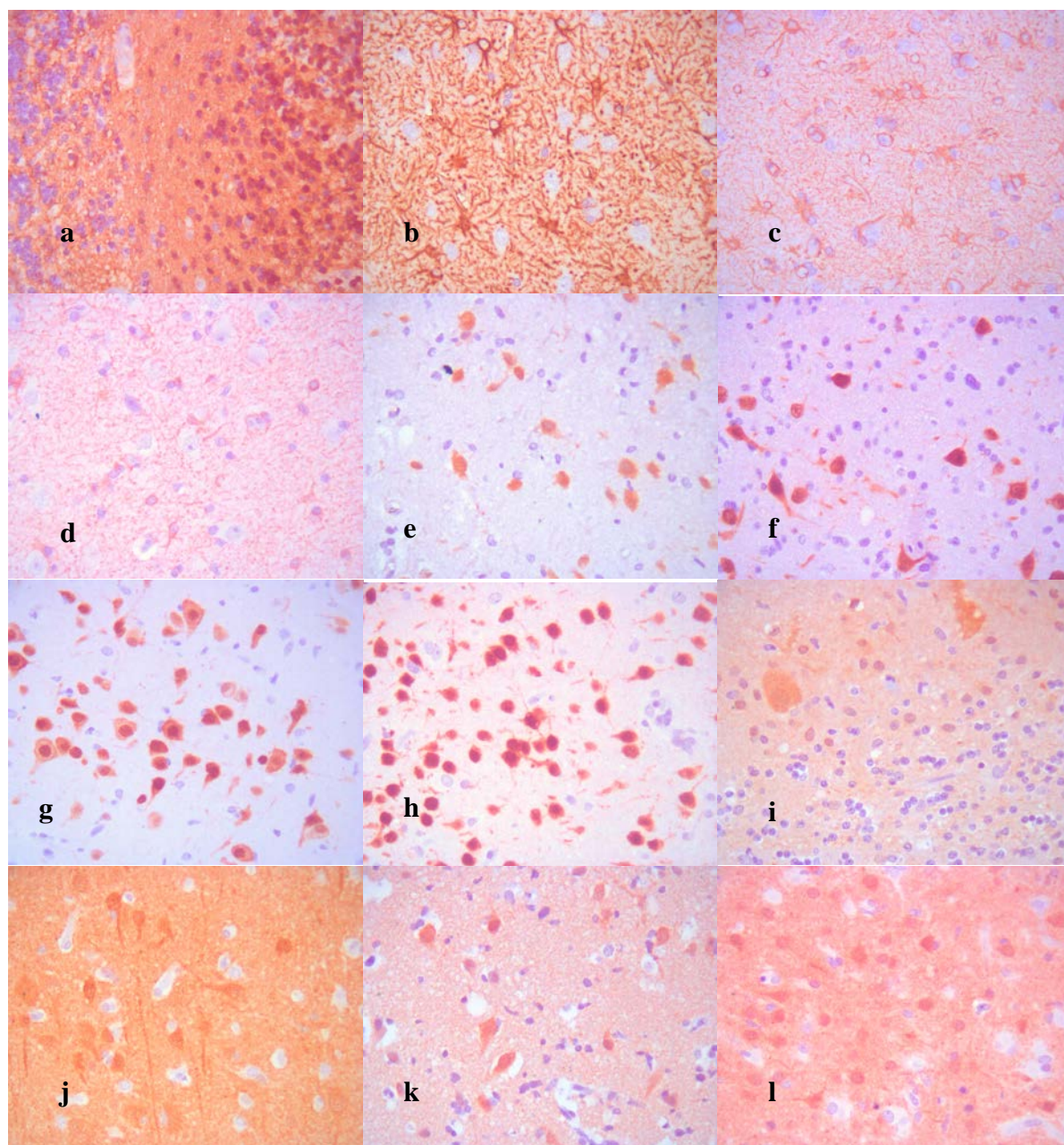


Figura 11 – Marcação IHQ dos casos de astrocitomas. a) Astrocitoma grau I, GFAP; b) Astrocitoma grau II GFAP; c) Astrocitoma grau III GFAP; d) Astrocitoma grau IV GFAP; e) Astrocitoma grau I NeuN; f) Astrocitoma grau II NeuN; g) Astrocitoma grau III NeuN; h) Astrocitoma grau IV NeuN; i) Astrocitoma grau I PGP; j) Astrocitoma grau II PGP; k) Astrocitoma grau III PGP; l) Astrocitoma grau IV PGP. Existe um decréscimo do nº de células marcadas para o ac GFAP, do grau I para o grau IV (a-d), verificando-se o contrário para os ac's NeuN (e-h) e PGP (i-l). Ampliação 400x.

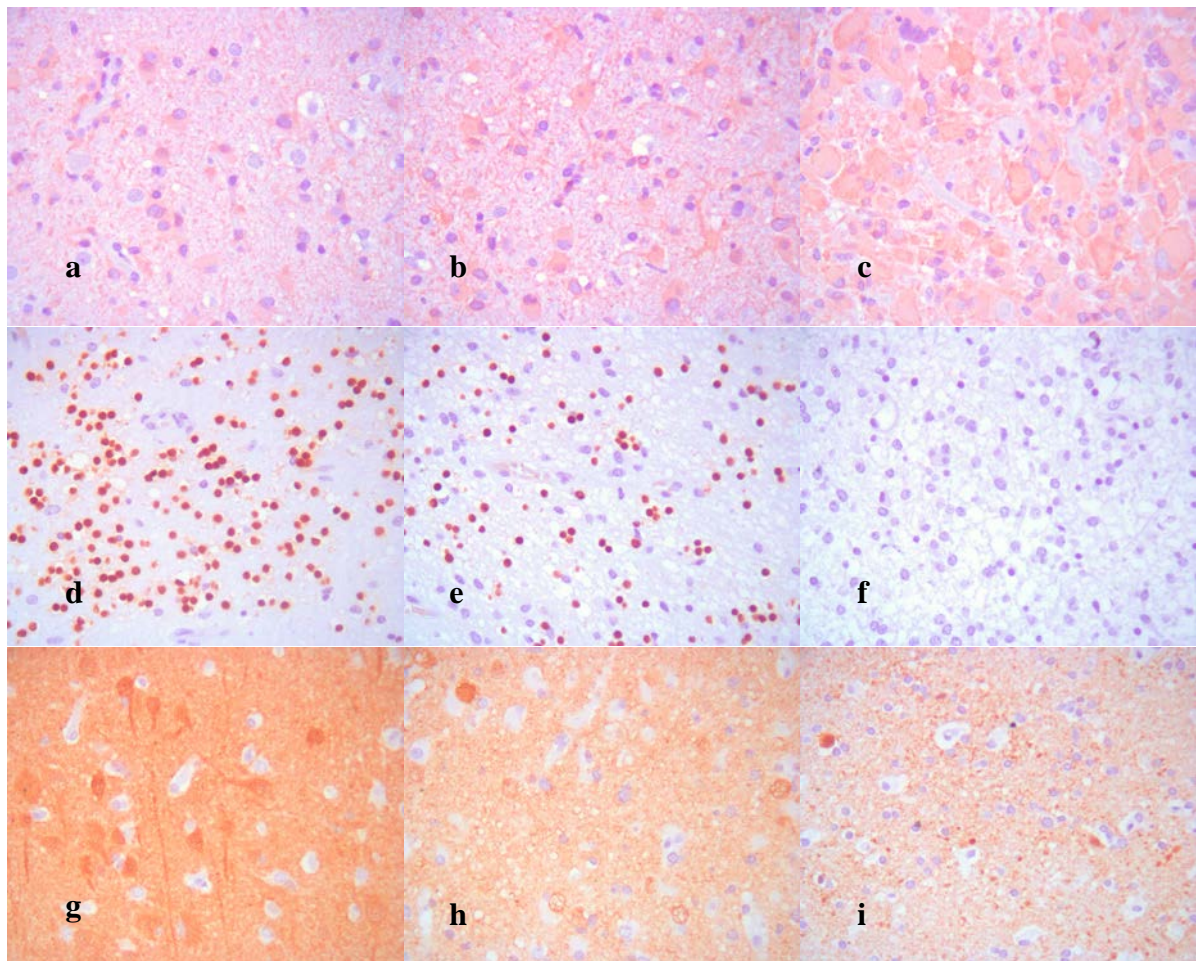


Figura 12 – Marcação IHQ dos casos de astrocitomas. a) Astrocitoma grau IV, GFAP, ZN; b) Astrocitoma grau IV, GFAP, ZT; c) Astrocitoma grau IV, GFAP, T; d) Astrocitoma grau I, NeuN, ZN; e) Astrocitoma grau I, NeuN, ZT; f) Astrocitoma grau I, NeuN, T; g) Astrocitoma grau II, PGP, ZN; h) Astrocitoma grau II, PGP, ZT; i) Astrocitoma grau II, PGP, T. É observável um aumento do nº de células marcadas para GFAP, de ZN para T (a-c); e a tendência contrária verifica-se para NeuN (d-f) e PGP (g-i). A tendência apresentada ocorre para todos os graus de severidade tumoral. Ampliação 400x.

2. Comparação entre astrocitomas e grupos de controlo

Quando comparados os quatro grupos de astrocitomas com os três grupos de controlos (apêndice VIII), as diferenças foram estatisticamente significativas, excetuando para GFAP/N/comp, NeuN/N/comp, NeuN/T/comp, PGP/N/N, PGP/C/N e PGP/T/comp (gráfico 3).

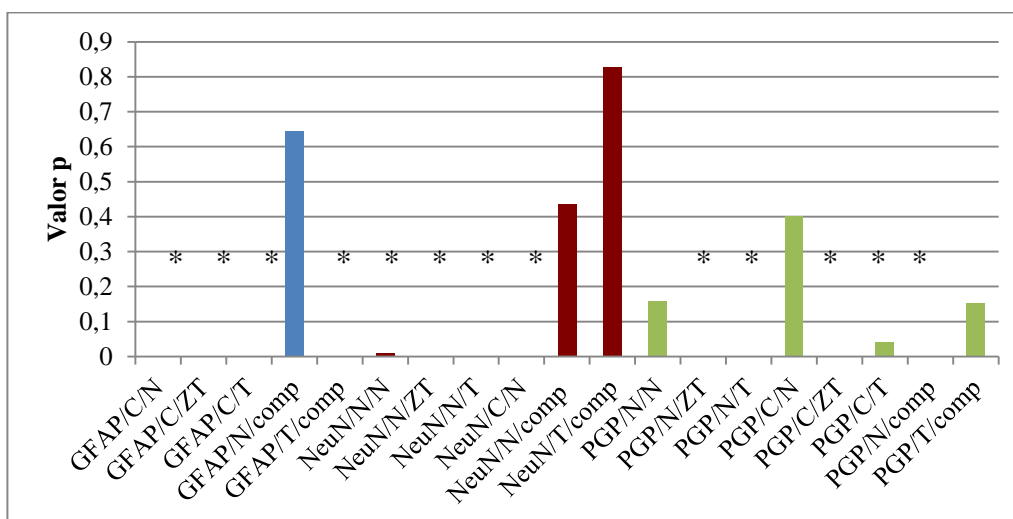


Gráfico 3 - Valores de significância estatística para astrocitomas vs controlos. Cada uma das barras do gráfico corresponde a um ac e zona. O valor de confiança utilizado foi de 95%, pelo que valores de p inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos e assinalados com asterisco.

Comparando, especificamente, os casos de epilepsia com a ZN dos astrocitomas de grau I, II, III e IV (apêndice IX), o número de casos com diferenças estatisticamente significativas é, tendencialmente, equivalente ao número dos que não as apresenta (gráfico 4). Não existe nenhuma predileção por ac ou por zona em qualquer dos quatro graus de anaplasia, à exceção da marcação com PGP/C/N e PGP/N/comp que têm valores de $p < 0,05$ nos quatro tipos de astrocitomas. Quando comparadas as metástases com a T de cada um dos astrocitomas (apêndice X), verifica-se que para GFAP/C/T e GFAP/T/comp existem, para os quatro graus de anaplasia, diferenças estatisticamente significativas, em oposição aos valores

de NeuN/T/comp e PGP/C/T, que nunca as atingem (gráfico 5). Tanto os valores para NeuN/N/T como para PGP/N/T apresentam, maioritariamente, diferenças, enquanto PGP/T/comp tende a apresentar valores de $p > 0.05$.

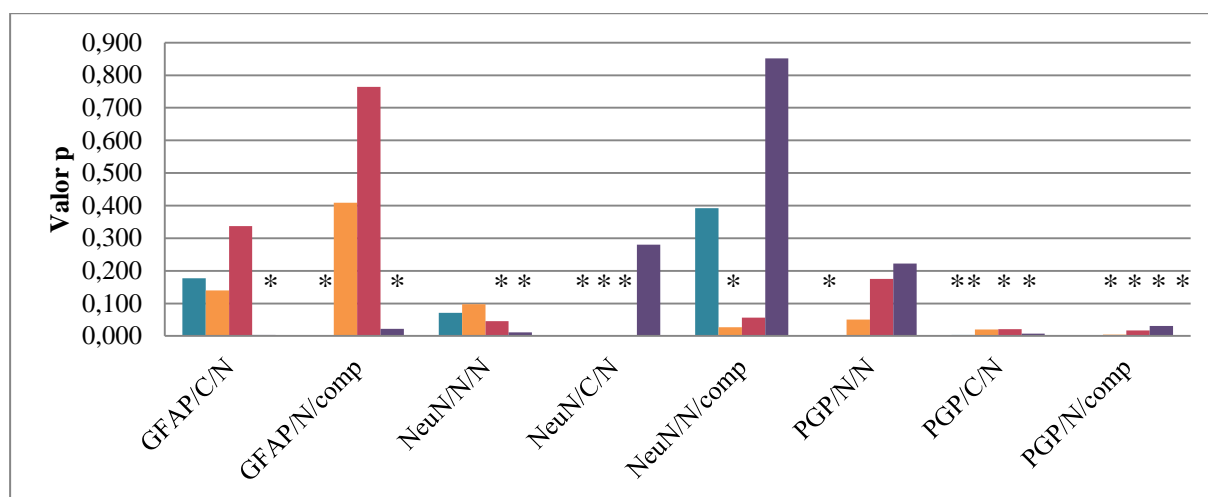


Gráfico 4 - Valores de significância estatística para epilepsia vs zona normal dos astrocitomas. A azul está representado o resultado da comparação entre epilepsia e zona normal de astrocitomas de grau I, a laranja o de grau II, a rosa o de grau III e a roxo o de grau IV.

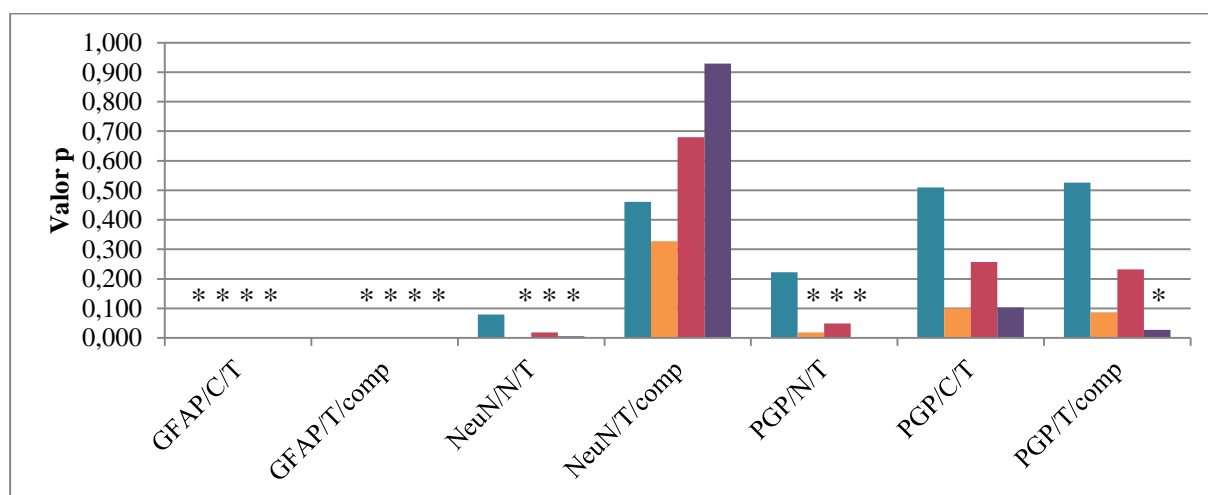


Gráfico 5 - Valores de significância estatística para metástases vs zona tumoral dos astrocitomas. A azul está representado o resultado da comparação entre metástases e zona tumoral de astrocitomas de grau I, a laranja o de grau II, a rosa o de grau III e a roxo o de grau IV.

Após comparação do grupo dos schwannomas com as três zonas dos vários grupos de astrocitomas (apêndice XI), verifica-se que, para todos os casos de marcações de GFAP, existem diferenças significativas, bem como para NeuN/N/N e NeuN/N/ZT (gráfico 6). A marcação de PGP nuclear apresenta diferenças significativas para os quatro grupos de astrocitomas, em oposição a PGP/C/N e PGP/C/ZT que não as apresentam para os astrocitomas de grau I, e a PGP/C/T e PGP/T/comp, para as quais não existem diferenças em quaisquer dos grupos. Enquanto que NeuN/N/T, maioritariamente, denota diferenças significativas, NeuN/T/comp apresenta, na sua maioria, valores de $p > 0.05$.

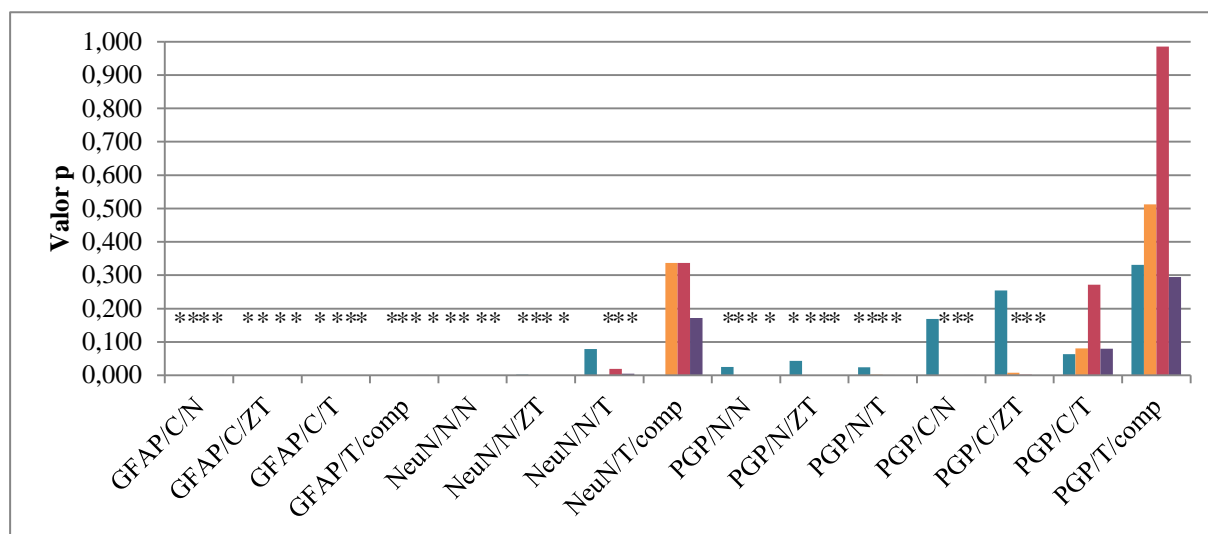


Gráfico 6 - Valores de significância estatística para schwannomas vs astrocitomas. A azul está representado o resultado da comparação entre schwannomas e astrocitomas de grau I, a laranja o de grau II, a rosa o de grau III e a roxo o de grau IV.

3. Comparação entre os vários graus de anaplasia dos astrocitomas

Procedeu-se igualmente à comparação entre os vários grupos de astrocitomas. Assim, os de baixo grau (grau I e II) apresentam um maior número de diferenças estatisticamente significativas entre si (tabela 13) do que os de alto grau (tabela 14), sendo que apenas a

marcação de NeuN citoplasmática para as três zonas em estudo apresentou diferenças entre os de grau III e IV (os valores de significância para os restantes acs encontra-se em apêndice XII). Tanto a comparação entre grau I e III, como entre grau I e IV, traduzem diferenças na marcação de GFAP/N/comp e GFAP/ZT/comp, bem como em NeuN/C/ZT, PGP/N/N, PGP/N/ZT, PGP/C/ZT, PGP/N/comp e ainda PGP/ZT/comp (tabelas 16 e 17). Já a marcação citoplasmática de GFAP, a marcação de NeuN por parte do sistema informático, a grande maioria de NeuN nuclear, e ainda PGP/C/T e PGP/T/comp não apresentam quaisquer diferenças estatisticamente significativas entre grau I e III e entre grau I e IV.

| Anticorpo | Diferenças significativas (p<0.05) | Valor p | Diferenças não significativas (p>0.05) | Valor p |
|-------------|------------------------------------|---------|--|---------|
| GFAP | GFAP/N/comp | 0,030 | GFAP/C/N | 0,978 |
| | GFAP/ZT/comp | 0,000 | GFAP/C/ZT | 0,619 |
| | | | GFAP/C/T | 0,699 |
| | | | GFAP/T/comp | 0,122 |
| NeuN | NeuN/C/N | 0,048 | NeuN/N/N | 0,900 |
| | NeuN/C/ZT | 0,021 | NeuN/N/ZT | 0,194 |
| | NeuN/N/comp | 0,026 | NeuN/N/T | 0,061 |
| | NeuN/ZT/comp | 0,045 | NeuN/C/T | 0,153 |
| | | | NeuN/T/comp | 0,857 |
| PGP | PGP/N/ZT | 0,026 | PGP/N/N | 0,065 |
| | PGP/N/comp | 0,001 | PGP/N/T | 0,174 |
| | PGP/ZT/comp | 0,004 | PGP/C/N | 0,169 |
| | | | PGP/C/ZT | 0,059 |
| | | | PGP/C/T | 0,209 |
| | | | PGP/T/comp | 0,196 |

Tabela 13 - Valores de significância estatística para astrocitomas grau I vs grau II.

| Anticorpo | Diferenças significativas (p<0.05) | Valor p | Diferenças não significativas (p>0.05) | Valor p |
|-----------|------------------------------------|---------|--|---------|
| NeuN | NeuN/C/N | 0,000 | NeuN/N/N | 0,168 |
| | NeuN/C/ZT | 0,000 | NeuN/N/ZT | 0,163 |
| | NeuN/C/T | 0,007 | NeuN/N/T | 0,455 |
| | | | NeuN/N/comp | 0,226 |
| | | | NeuN/ZT/comp | 0,197 |
| | | | NeuN/T/comp | 0,624 |

Tabela 14 - Valores de significância estatística para astrocitomas grau III vs grau IV (NeuN).

| Anticorpo | Diferenças significativas (p<0.05) | Valor p | Diferenças não significativas (p>0.05) | Valor p |
|-----------|------------------------------------|---------|--|---------|
| GFAP | GFAP/N/comp | 0,030 | GFAP/C/N | 0,828 |
| | GFAP/ZT/comp | 0,000 | GFAP/C/ZT | 0,633 |
| | | | GFAP/C/T | 0,313 |
| | | | GFAP/T/comp | 0,075 |
| NeuN | NeuN/C/ZT | 0,015 | NeuN/N/N | 0,961 |
| | | | NeuN/N/ZT | 0,084 |
| | | | NeuN/N/T | 0,415 |
| | | | NeuN/C/N | 0,135 |
| | | | NeuN/C/T | 0,440 |
| | | | NeuN/N/comp | 0,055 |
| | | | NeuN/ZT/comp | 0,495 |
| | | | NeuN/T/comp | 0,772 |
| PGP | PGP/N/N | 0,028 | PGP/N/T | 0,446 |
| | PGP/N/ZT | 0,001 | PGP/C/T | 0,571 |
| | PGP/C/N | 0,031 | PGP/T/comp | 0,561 |
| | PGP/C/ZT | 0,013 | | |
| | PGP/N/comp | 0,001 | | |
| | PGP/ZT/comp | 0,000 | | |

Tabela 16 - Valores de significância estatística para astrocitomas grau I vs grau III.

| Anticorpo | Diferenças significativas (p<0.05) | Valor p | Diferenças não significativas (p>0.05) | Valor p |
|-------------|------------------------------------|---------|--|---------|
| GFAP | GFAP/N/comp | 0,000 | GFAP/C/N | 0,080 |
| | GFAP/ZT/comp | 0,000 | GFAP/C/ZT | 0,494 |
| | GFAP/T/comp | 0,008 | GFAP/C/T | 0,839 |
| NeuN | NeuN/N/ZT | 0,001 | NeuN/N/N | 0,222 |
| | NeuN/C/N | 0,000 | NeuN/N/T | 0,141 |
| | NeuN/C/ZT | 0,000 | NeuN/N/comp | 0,391 |
| | NeuN/C/T | 0,008 | NeuN/ZT/comp | 0,692 |
| | | | NeuN/T/comp | 0,420 |
| PGP | PGP/N/N | 0,032 | PGP/C/N | 0,163 |
| | PGP/N/ZT | 0,000 | PGP/C/T | 0,215 |
| | PGP/N/T | 0,032 | PGP/T/comp | 0,083 |
| | PGP/C/ZT | 0,002 | | |
| | PGP/N/comp | 0,001 | | |
| | PGP/ZT/comp | 0,000 | | |

Tabela 17 - Valores de significância estatística para astrocitomas grau I vs grau IV.

Quando comparados astrocitomas de grau II com grau III, apenas o marcador PGP apresenta diferenças – tabela 18 (restantes valores de significância em apêndice XIII). Entre astrocitomas de grau II e grau IV, apesar da maioria das marcações não apresentar diferenças estatisticamente significativas, GFAP/N/comp, NeuN/C/N, NeuN/C/ZT, PGP/N/ZT e ainda PGP/ZT/comp apresentam-nas para os três acs (tabela 20).

| Anticorpo | Diferenças significativas (p<0.05) | Valor p | Diferenças não significativas (p>0.05) | Valor p |
|------------|------------------------------------|---------|--|---------|
| PGP | PGP/ZT/comp | 0,024 | PGP/N/N | 0,550 |
| | | | PGP/N/ZT | 0,424 |
| | | | PGP/N/T | 0,434 |
| | | | PGP/C/N | 0,393 |
| | | | PGP/C/ZT | 0,828 |
| | | | PGP/C/T | 0,396 |
| | | | PGP/N/comp | 0,966 |
| | | | PGP/T/comp | 0,429 |

Tabela 18 - Valores de significância estatística para astrocitomas grau II vs grau III (PGP).

| Anticorpo | Diferenças significativas (p<0.05) | Valor p | Diferenças não significativas (p>0.05) | Valor p |
|-------------|------------------------------------|---------|--|---------|
| GFAP | GFAP/N/comp | 0,001 | GFAP/C/N | 0,064 |
| | | | GFAP/C/ZT | 0,929 |
| | | | GFAP/C/T | 0,825 |
| | | | GFAP/ZT/comp | 0,609 |
| | | | GFAP/T/comp | 0,295 |
| NeuN | NeuN/C/N | 0,000 | NeuN/N/N | 0,291 |
| | NeuN/C/ZT | 0,000 | NeuN/N/ZT | 0,059 |
| | | | NeuN/N/T | 0,911 |
| | | | NeuN/C/T | 0,083 |
| | | | NeuN/N/comp | 0,226 |
| | | | NeuN/ZT/comp | 0,197 |
| | | | NeuN/T/comp | 0,624 |
| PGP | PGP/N/ZT | 0,030 | PGP/N/N | 0,546 |
| | PGP/ZT/comp | 0,038 | PGP/N/T | 0,564 |
| | | | PGP/C/N | 0,943 |
| | | | PGP/C/ZT | 0,358 |
| | | | PGP/C/T | 0,931 |
| | | | PGP/N/comp | 0,755 |
| | | | PGP/T/comp | 0,670 |

Tabela 20 - Valores de significância estatística para astrocitomas grau II vs grau IV.

4. Comparação individual entre astrocitomas e grupos controlo

Compararam-se, ainda, os grupos controlos com cada um dos astrocitomas separadamente. As significâncias estatísticas para a primeira comparação obedeceram, de uma forma geral, a um padrão constante (gráfico 7 e apêndice XIV). Registaram-se diferenças estatísticas para todos os casos de marcação com GFAP, exceto GFAP/C/N nos controlos vs astrocitomas I e IV, e GFAP/N/comp nos controlos vs astrocitomas II e III. Quanto ao marcador NeuN, NeuN/N/ZT e NeuN/N/T apresentaram sempre diferenças significativas, enquanto que NeuN/T/comp nunca apresentou, sendo que os restantes não obedeceram a um

padrão de significância estatística constante entre os quatro graus de anaplasia. Para o marcador PGP, o número de casos que apresentaram diferenças foi sensivelmente equivalente ao número de casos que não as apresentaram.

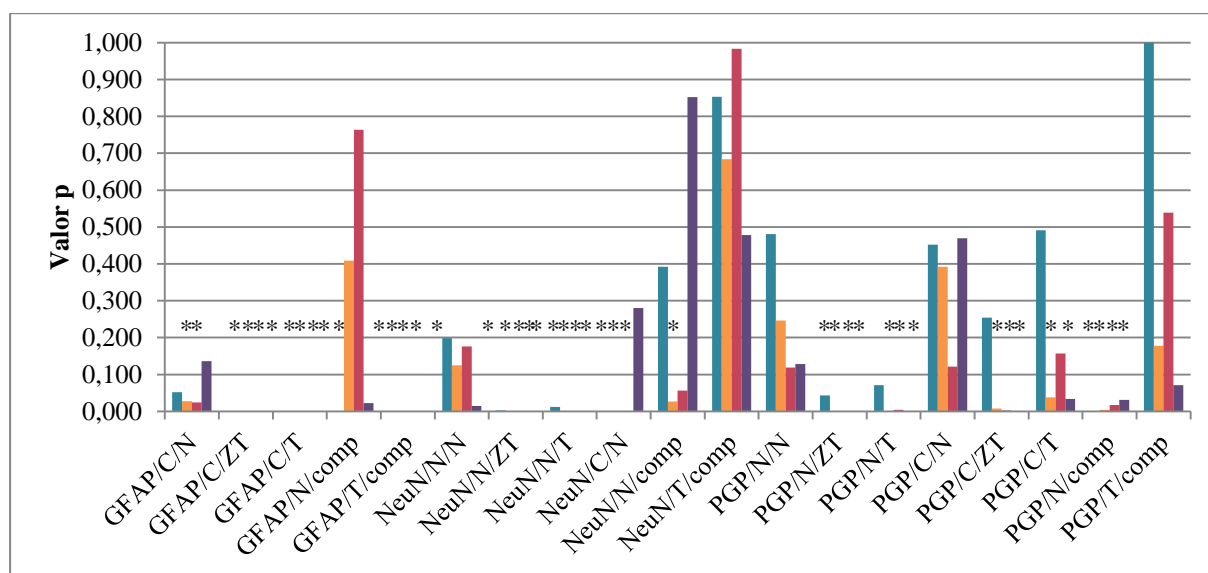


Gráfico 7 - Valores de significância estatística para controlos *vs* astrocitomas. A azul está representado o resultado da comparação entre controlos e astrocitomas de grau I, a laranja o de grau II, a rosa o de grau III e a roxo o de grau IV.

5. Análise dos casos controlo

Após realização das médias ponderadas das avaliações IHQs para os casos controlo (apêndice XV), verifica-se que o grupo da epilepsia registou o valor de média ponderada mais elevado para os três acs, GFAP, NeuN e PGP 9.5, com 3.000, 3.217 e 3.717, respetivamente (gráfico 8). Ao dos schwannomas correspondeu o segundo valor mais elevado para o ac GFAP (1.275), seguido do das metástases, com 0.050. No entanto, ao grupo dos schwannomas correspondeu, igualmente, o valor mais baixo para o ac NeuN (0), sendo que para as metástases foi registada uma média de 0.250.

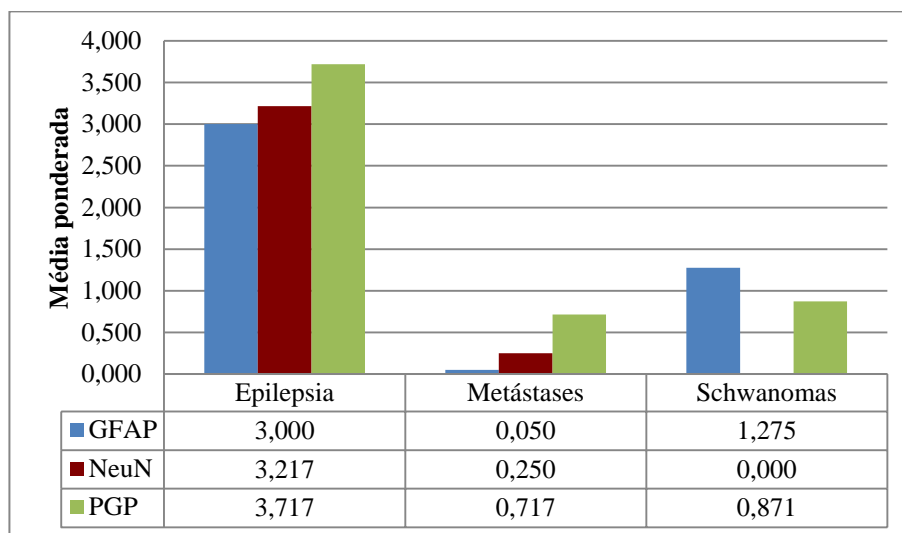


Gráfico 8 – Média ponderada das avaliações IHQs dos casos controlo, para cada ac.

V. Discussão dos resultados

Apesar da plethora de estudos que reforçam a natureza neuronal específica da PGP 9.5, foram descritos na literatura dois casos de marcação em astrocitomas, e observada marcação de uma quantidade relevante de tumores de linhagem glial na rotina diagnóstica de tumores cerebrais do LN, levantando a hipótese de um possível papel desta proteína nas células gliais normais, na gliose reativa ou na tumorigénese da linhagem glial. Com o presente estudo, pretendeu-se, desta forma, caracterizar a marcação IHQ da proteína PGP 9.5 em células astrocitárias normais, reativas e tumorais, neste caso, de astrocitomas dos quatro graus de anaplasia. Para tal, foi igualmente aplicado um ac astrocitário, anti-GFAP, e um neuronal, anti-NeuN.

De seguida, são analisados os resultados da marcação dos casos controlos, dos astrocitomas, e por fim, os resultados da comparação entre os vários graus de astrocitomas (I a IV), dois a dois, e entre estes e os casos controlo.

1. A marcação dos casos controlos correspondeu ao expectável

A marcação IHQ obtida deve ser considerada idónea, não só pela análise dos controlos internos de cada caso, como também das amostras controlo incluídas. De facto, para os casos de cirurgia da epilepsia, a marcação obtida para os três acs, próxima do máximo valor avaliativo da escala (figura 13), correspondeu ao esperado já que os elementos gliais e neuronais estão normalmente presentes no tecido nervoso. Pelo contrário, nas metástases, o mesmo não seria de esperar por parte de nenhum dos acs, já que não há evidência de marcação por GFAP, NeuN ou PGP em elementos tecidulares pulmonares (embora o PGP possa ter marcação no sistema neuroendócrino pulmonar ^[1]) ou mamários. No entanto, esta

acabou por se verificar porque, habitualmente, estão presentes elementos celulares gliais e neuronais do parênquima cerebral no tecido de ressecção cirúrgica (figura 14). Por fim, nenhum dos casos de schwannomas apresentou marcação para o NeuN, observação que corresponde ao que se encontra descrito, já que se trata de um marcador específico para células neuronais no SNC e SNP, e, apesar de terem sido apontadas algumas exceções a esta marcação, os schwannomas não fazem parte delas.^[62,64] Quanto ao GFAP e PGP, a marcação verificada nos schwannomas apresentou alguma inconsistência, sendo que existem casos com um número considerável de células marcadas e outros sem qualquer marcação (figura 15).

O GFAP, apesar de essencialmente um marcador astrocitário, está também presente em células de Schwann.^[65,67] No entanto, a percentagem de schwannomas que evidenciam esta marcação tem sido referida como inconstante, de acordo com os estudos primeiramente realizados, em 1984, por Memoli *et al.*^[69] Apesar dos vários artigos publicados no que concerne a este assunto,^[69-74] a razão desta variabilidade encontra-se por explicar. Jessen *et al.* referem, no entanto que a GFAP está presente num estadio relativamente avançado no desenvolvimento das células de Schwann,^[75] e que, após o nascimento, as não produtoras de mielina e as que se desdiferenciam após uma lesão de um nervo, expressam GFAP (as sintetizadoras de mielina expressam vimentina).^[75,76] Desta forma, o eventual estadio de diferenciação das células tumorais que constituíram os schwannomas em estudo poderá explicar a variabilidade apresentada, embora ela possa também estar dependente da localização e volume destes tumores.^[74]

Quanto ao PGP, apesar de Shimada *et al.*^[47] referirem a sua marcação em todos os schwannomas estudados, a amostra foi bastante reduzida, apenas dez casos. Dado que também são escassos os estudos sobre este assunto, seria importante alargar a amostra em futuros trabalhos, no sentido de tentar identificar as circunstâncias desta marcação por parte do PGP.

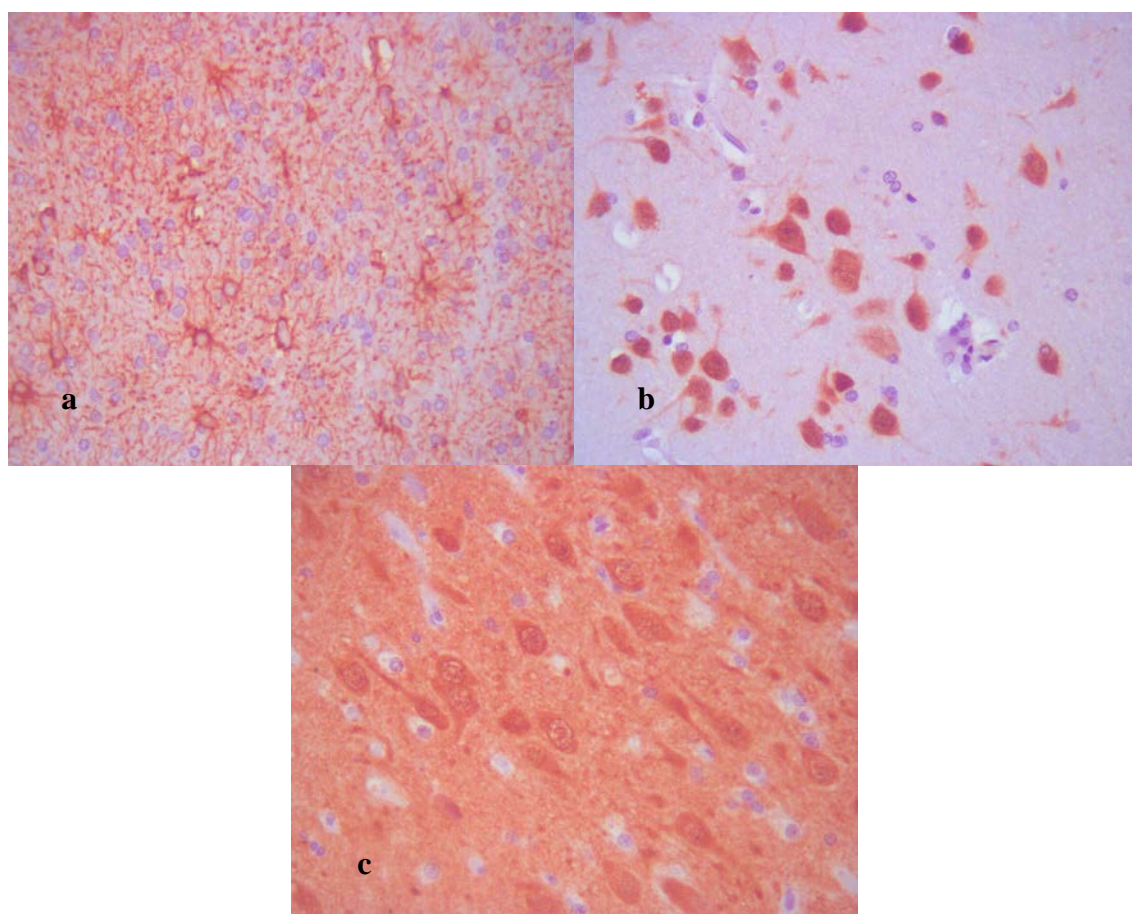


Figura 13 – Marcação IHQ dos casos de epilepsia. a) GFAP; b) NeuN; c) PGP. Ampliação 400x.

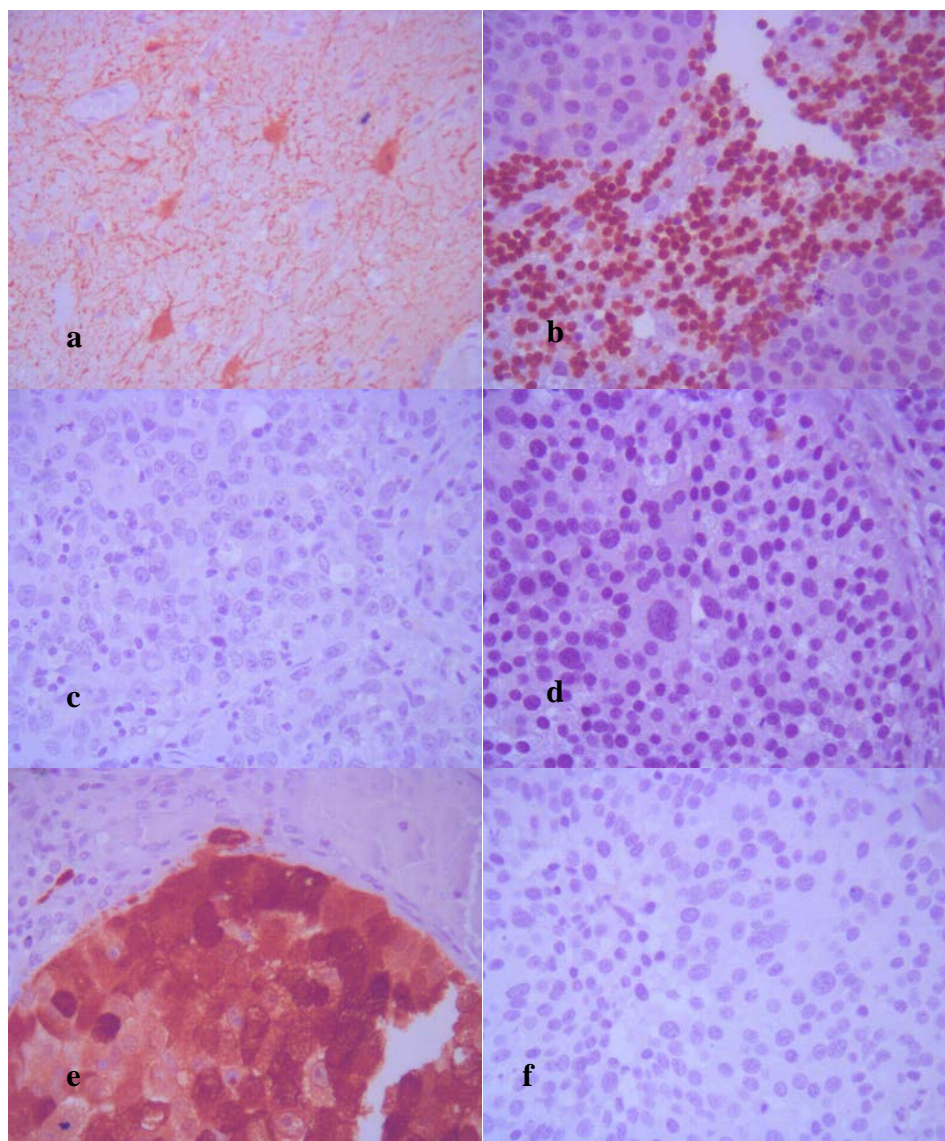


Figura 14 – Marcação IHQ dos casos de metástases. a e b) GFAP; c e d) NeuN; e e f) PGP. Em a), c) e e) denotam-se elementos não metastáticos marcados, em contraste com o parênquima tumoral metastático que, como expectável, não apresenta qualquer marcação. Ampliação 400x.

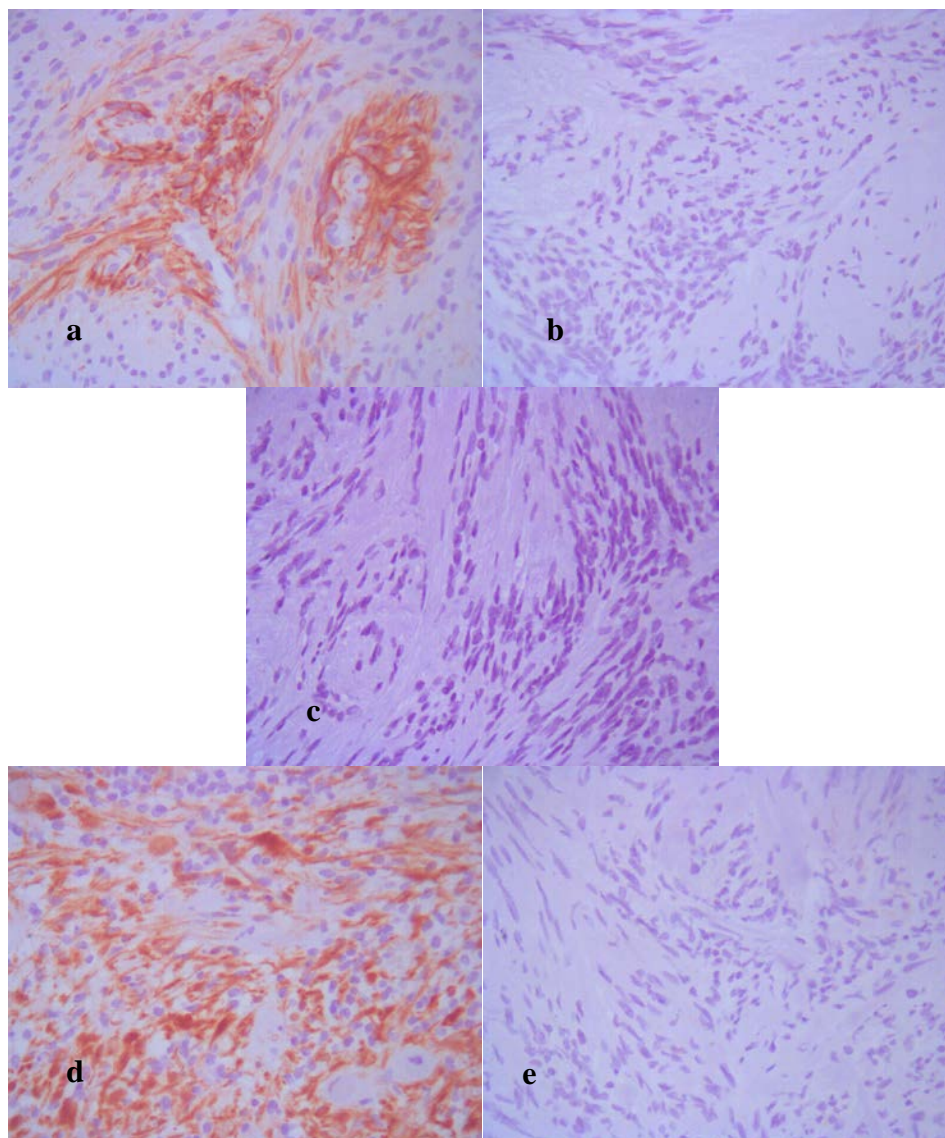


Figura 15 – Marcação IHQ dos casos de schwannomas. a e b) GFAP; c) NeuN (não marca); d e e) PGP. Para os acs GFAP e PGP, existem casos sem qualquer marcação e outros com bastantes células marcadas. Ampliação 400x.

2. Existe semelhança de resultados entre a marcação apresentada por NeuN e PGP 9.5 em astrocitomas

Tanto na análise por grau (I a IV) de malignidade tumoral, como por zona a estudar, a marcação pelo NeuN e PGP foi diretamente proporcional ao grau tumoral, e diminui da ZN para a T.

2.1 A marcação de NeuN diminui da zona normal para a zona tumoral nos astrocitomas

Os astrócitos tornam-se “ativos” através da intervenção de mediadores inflamatórios numa pletora de patologias do SNC, incluindo inflamação, trauma, isquémia, infeções, doenças neurodegenerativas, e ainda no envelhecimento normal.^[95,96] Esta ativação tem sido considerada protetora, destruindo agentes patogénicos, induzindo a remoção de restos celulares, e promovendo a reparação tecidular. No entanto, a sua ativação em excesso pode ser deletéria.^[97-99] Na realidade, vários autores demonstraram uma correlação entre a ativação glial e a morte de neurónios em co-culturas^[100-104], sendo que o mesmo parece ocorrer *in vivo* em muitas das patologias acima referidas.^[105-108]

Esta associação entre neuroinflamação e neurodegeneração e a ativação glial pareceu ser demonstrada igualmente no presente estudo, já que houve uma diminuição considerável do número de neurónios marcados da ZN para a ZT (figura 12 d-e), onde estão presentes células astrocitárias reativas. É igualmente marcada a diferença entre a ZT e a T, sendo que na última não existe qualquer marcação por parte do NeuN (figura 12 e-f), neste caso como seria expectável já que não há referência à marcação deste ac em células gliais.^[63] No entanto, não é possível deixar de admitir que estes resultados possam ser normais, uma vez que a ZT pode

ser constituída preferencialmente por substância branca (onde não há neurónios) e não por substância cinzenta, e a ZN maioritariamente por substância cinzenta. Apenas em alguns casos houve marcação de um número bastante reduzido de neurónios no parênquima tumoral astrocitário, os quais terão sido “aprisionados” pelo seu crescimento infiltrativo (figura 16).

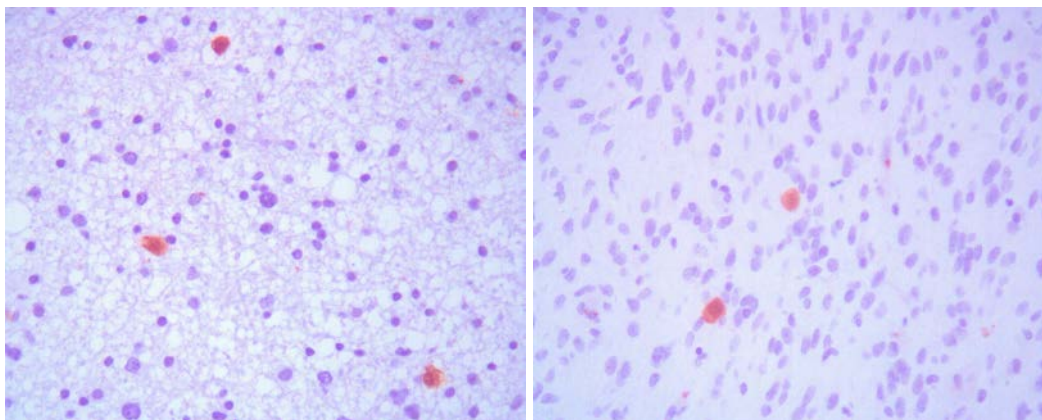


Figura 16 – Marcação IHQ de neurónios “aprisionados” em parênquima tumoral astrocitário. a) Astrocitoma grau II, NeuN; b) Astrocitoma grau III NeuN. Ampliação 400x.

2.2 O número de células marcadas por NeuN aumenta proporcionalmente com o grau de malignidade tumoral

A correlação entre o desenvolvimento de cancro e a inflamação é, hoje em dia, geralmente aceite. Os tumores caracterizam-se usualmente por tecidos com inflamação, incluindo infiltração celular e ativação do estroma, mesmo num estadio precoce. Desta forma, a inflamação gera, não só alterações do microambiente, que promovem o cancro, como também alterações sistémicas, favoráveis à progressão e metastização do mesmo. ^[109-114] Esta relação é recíproca, sendo que o desenvolvimento e progressão tumorais induzem inflamação, gerando um ciclo vicioso, não só local, como sistémico. Chechlinska *et al* consideram, até, que um dos elementos essenciais do cancro deveria ser denominado por “ambiente

inflamatório”, para melhor refletir os efeitos sistémicos que o desenvolvimento cancerígeno induz. ^[109,110]

Tem sido estudada a eventual importância que os elementos gliais e neuronais poderão ter no “microambiente” tumoral, e, conseqüentemente, na progressão dos gliomas. ^[115, 116] No que diz respeito aos neurónios, é sabido que estes se encontram frequentemente adjacentes a áreas tumorais, sugerindo uma interação entre estes dois tipos de células. Está assente, também, que os neurónios, quando imunocompetentes, suprimem a inflamação do SNC e a oncogénese, já que detectam o “perigo eminente” de proliferação autónoma de células gliais. Tal facto leva a uma regulação aumentada de PD-L1 (*programmed cell death ligand 1*), também conhecido como CD274, dependente de interferão β (IFN β), extensamente estudado devido à sua capacidade de ligação a um receptor nas células de glioma. No caso de neurónios deficientes em IFN β , existe uma incapacidade de prevenir esta mesma inflamação, bem como o crescimento tumoral, já que não expressam PD-L1. ^[110,117] Os níveis de expressão de PD-L1 em neurónios associados ao tumor foram, assim, positivamente correlacionados com uma melhoria de prognóstico de doentes com glioblastoma. ^[118]

Embora haja ainda um longo caminho a percorrer no que concerne ao estabelecimento definitivo desta relação entre neurónios e células tumorais de gliomas, os estudos acima referidos poderão explicar a relação direta entre o número de neurónios marcados com NeuN verificado na nossa amostragem, e o grau de anaplasia tumoral nas três zonas investigadas, numa possível tentativa de supressão inflamatória e de progressão tumoral.

No que diz respeito aos astrócitos, é sabido que os não neoplásicos podem ser convertidos num fenótipo “reativo” pelo “microambiente” do glioma e secretarem factores que influenciam a biologia tumoral. ^[115] Neste contexto, os astrócitos foram implicados na progressão de tumores cerebrais, e os reativos associados às células de gliomas no SNC. ^[119]

Apesar destes aspetos, e de ser conhecido que em volta da vasculatura dos gliomas se encontram astrócitos que expressam GFAP (semelhantes, a nível estrutural, aos astrócitos reativos encontrados noutros tipos de patologia cerebral ^[115]), a extensão da marcação de GFAP na ZT e na considerada normal, nos limítrofes desse mesmo tumor, não foi ainda extensamente explorado. Tendo em conta os estudos referidos relativamente ao grau de anaplasia tumoral, a ZT, adjacente à tumoral, bem como a ZN, poderão obedecer à mesma regra, e, assim, explicar o facto de, no presente estudo, em ambas existir uma relação inversa entre o número de células marcadas e o grau de anaplasia celular. No entanto, são necessários estudos posteriores por forma a explicar mais apropriadamente estes resultados.

2.3 A marcação de PGP apresenta a mesma tendência do NeuN - diminui da zona normal para a zona tumoral, e aumenta com o grau de anaplasia

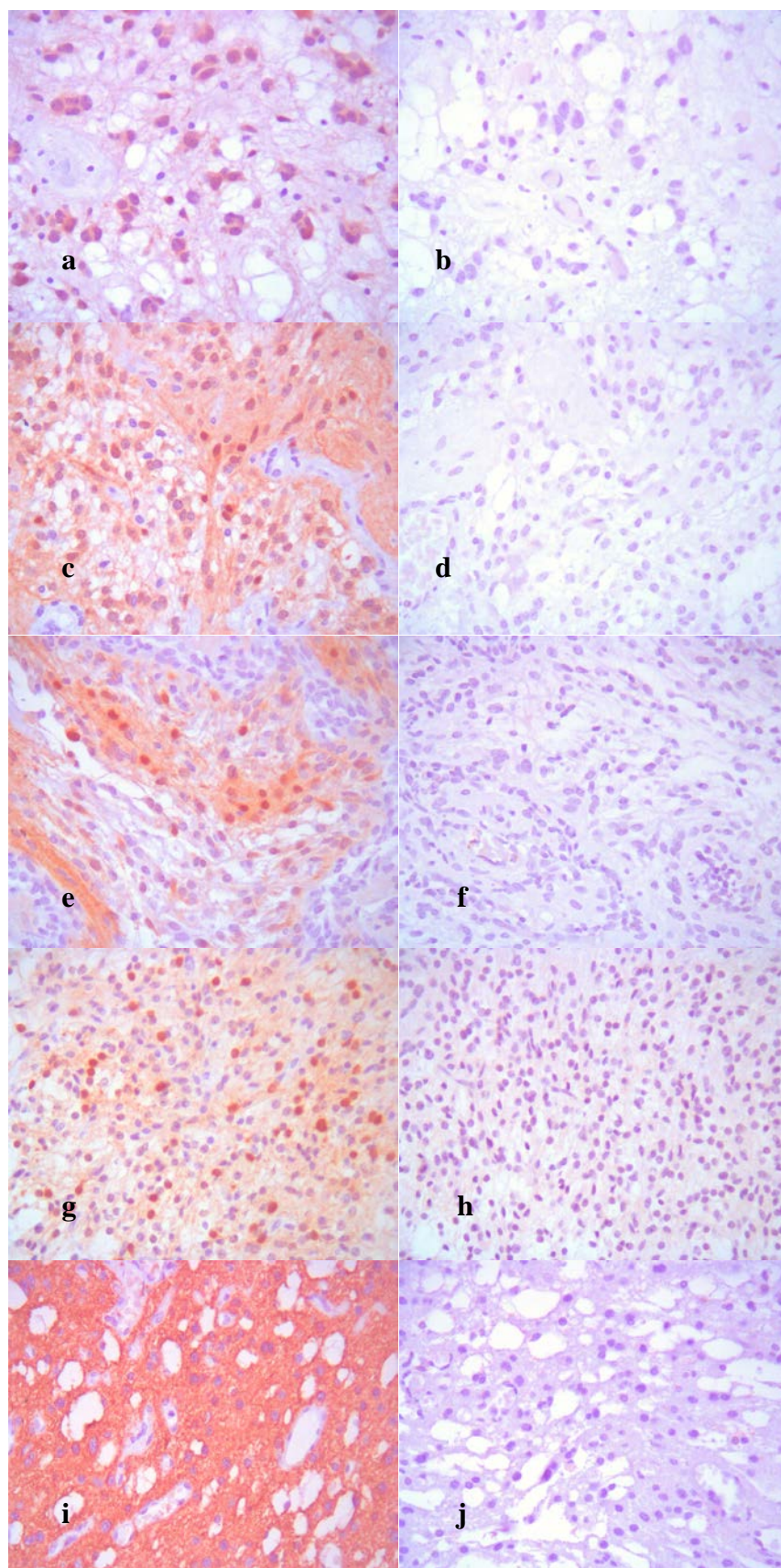
A marcação oferecida pelo PGP foi, em tudo, semelhante à obtida por NeuN, e tendencialmente oposta à do GFAP, reforçando a sua natureza neuronal. Tal como na marcação pelo NeuN, em alguns casos não foi evidenciada qualquer marcação da região tumoral. No entanto, apresentaram-se neurónios “aprisionados” marcados em maior quantidade do que pelo NeuN (figura 12 i). Em sete casos, verificou-se ainda que, embora igualmente marcados os referidos elementos, outros, nomeadamente de natureza glial e do estroma tumoral, também se apresentaram reativos para o ac PGP (figura 17). Esta reatividade foi maioritariamente citoplasmática, e, embora presente marcação de “fundo” em alguns dos casos, esta não se estendia aos controlos internos, nomeadamente vasos, reforçando a sua especificidade. Quando analisada a marcação pelo NeuN nestes casos, verificou-se que era inexistente, levantando a hipótese de uma natureza mista, glioneuronal dos mesmos (figura 17).

Na tentativa de melhor caracterizar estes casos, foram estudadas as ZT respetivas, não tendo sido observado um padrão reprodutível de marcação de natureza astrocitária. Em dois dos casos houve, de facto, marcação, tal como na T; noutros dois, apenas alguns elementos tecidulares esboçaram marcação astrocitária, e três não apresentaram mesmo qualquer marcação de natureza não neuronal.

Ao analisar a informação clínica correspondente, verificou-se que, embora todos os casos tenham abrangido doentes com idades inferiores a 32 anos, não existiu uma predileção clara no que diz respeito à idade (tabela 23). Quanto à localização tumoral, três dos casos eram do lobo frontal, um do parietal, um do occipital, e dois do cerebelo. Apenas dois dos sete casos correspondiam a doentes do sexo feminino, e a maioria deles, quatro, correspondeu a astrocitomas pilocíticos, de grau I. O número é, no entanto, reduzido, pelo que limita a ilação de possíveis conclusões.

| Número histológico | Idade | Género | Localização | Diagnóstico |
|--------------------|-------|--------|-------------|----------------------|
| Caso 1 | 12 | M | Cerebelar | Astrocitoma grau I |
| Caso 2 | 3 | F | Cerebelar | Astrocitoma grau I |
| Caso 3 | 13 | M | Parietal | Astrocitoma grau I |
| Caso 4 | 16 | F | Occipital | Astrocitoma grau I |
| Caso 5 | 26 | M | Frontal | Astrocitoma grau II |
| Caso 6 | 32 | M | Frontal | Astrocitoma grau III |
| Caso 7 | 27 | M | Frontal | Glioblastoma |

Tabela 23 – Informação clínica dos casos com marcação de PGP 9.5 em células astrocitárias tumorais.



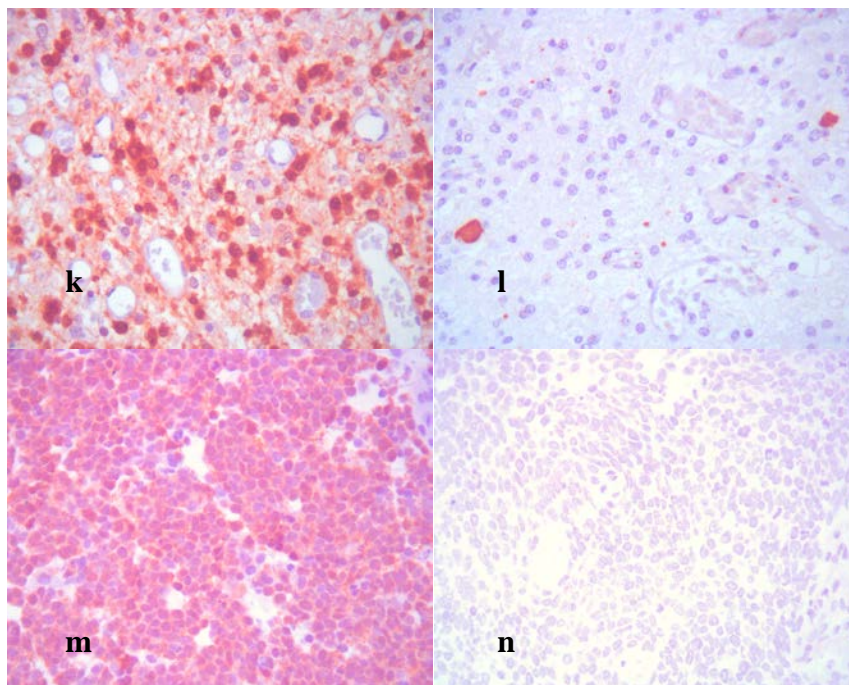


Figura 17 – Marcação IHQ da zona tumoral dos casos de astrocitomas. a) Astrocitoma grau I, PGP; b) Astrocitoma grau I, NeuN; c) Astrocitoma grau I, PGP; d) Astrocitoma grau I, NeuN; e) Astrocitoma grau I, PGP; f) Astrocitoma grau I, NeuN; g) Astrocitoma grau I, PGP; h) Astrocitoma grau I, NeuN; i) Astrocitoma grau II, PGP; j) Astrocitoma grau II, NeuN; k) Astrocitoma grau III, PGP; l) Astrocitoma grau III, NeuN; m) Astrocitoma grau IV, PGP; n) Astrocitoma grau IV, NeuN. Ampliação 400x.

Foram reportados dois casos de marcação de PGP em astrocitomas, a cujas publicações não tivemos acesso, desconhecendo, portanto, as condições experimentais que estiveram na base destes resultados. Giambanco *et al* referem que, de acordo com estudos em duas linhas celulares de glioma, *rat* C6 e *human* GL15, a PGP estaria expressa de forma máxima durante a fase de crescimento, decrescendo progressivamente com a diminuição da replicação, decréscimo esse que os autores dizem desconhecer se corresponde a uma diminuição da taxa replicativa, ou a um aumento da degradação proteica. É sugerido que estes resultados possam ter sido decorrentes do facto da cultura ter, de alguma forma, induzido a

expressão de PGP, a qual, por definição na literatura, não ocorre no SN. Sugerem, ainda assim, a hipótese desta proteína desempenhar um papel importante, tanto nas células gliais normais durante o desenvolvimento cerebral, como na gliose reativa ou na tumorigénese da linhagem glial. ^[49] Não foram, no entanto, realizados estudos posteriores no sentido de clarificar este tópico.

No presente estudo, a fase de crescimento e de replicação mais exacerbada corresponderá ao grau IV de anaplasia tumoral, no qual se verificou, de facto, a maior marcação da proteína nas três zonas em estudo. Tendo em conta as funções de desubiquitinação recentemente a ela associadas, ^[10,11] a sua sobre-expressão poderá revelar um possível papel na supressão ou progressão tumorais já que parece reverter o processo de ubiquitinação de proteínas destinadas a proteólise. No entanto, mais uma vez, terão de ser realizados estudos mais aprofundados no sentido de esclarecer esta associação.

3. Existe uma diminuição gradual de expressão de GFAP do grau I ao grau IV tumoral

Quando analisados os resultados para a GFAP, verificamos que os valores da escala avaliativa tenderam a progredir de forma inversa aos apresentados pelo NeuN e PGP. Existe, desta forma, uma relação inversa entre o aumento do grau de anaplasia tumoral e a quantidade de células marcadas com GFAP, para as três zonas em estudo (figura 11 a-d).

São alguns os estudos que referem que a expressão de GFAP em gliomas é consideravelmente variável. Em 1985, Gullotta *et al* notam o facto de, apesar deste marcador estar usualmente presente em grandes concentrações em gliomas diferenciados e de crescimento lento, portanto de baixo grau de anaplasia, se terem identificado casos de marcação nos malignos. ^[77] Inclusivé, são referidos glioblastomas que expressam GFAP numa

proporção equivalente aos astrocitomas anaplásicos,^[78] ou apresentam, mesmo, aumento de expressão de todas as isoformas de GFAP.^[79] Lyubimova *et al* referem, recentemente, que, em amostras de soro humano, se verificam níveis elevados de GFAP em glioblastomas, comparativamente a astrocitomas de grau III, de grau I, metástases e controlos saudáveis.^[80] De facto, já Jung *et al* tinham levantado a hipótese da GFAP ser libertada de tumores astrogliais, especialmente gliomas malignos, para o soro, podendo, desta forma, ser utilizado como biomarcador diagnóstico para os glioblastomas. Os autores referem, no entanto, que seria apenas aplicado, com uma especificidade de 100%, a doentes com lesões supratentoriais únicas, e que não se verificou correlação entre a expressão de GFAP sérica e IHQ.^[81]

Atualmente é aceite que os glioblastomas, com um elevado grau de proliferação, contém um maior número de astrócitos indiferenciados e uma fração de células estaminais multipotentes, altamente tumorigénicas, e que, portanto, não expressam extensivamente GFAP.^[78,82] Esta expressão parece, de facto, traduzir o grau de diferenciação dos astrócitos, sendo extensamente utilizado no diagnóstico e diferenciação de tumores cerebrais.^[78,79,83] Pode ser utilizado num painel de acs juntamente com a Nestina,^[84] um marcador prognóstico de malignidade, cuja expressão foi observada de forma abundante em células do SNC em processo de transformação neoplásica, particularmente células da glia.^[85,86] A diminuição da expressão de GFAP tem sido repetidamente associada ao crescimento e malignidade de tumores gliais^[87,88], diminuição mais proeminente em gliomas de alto do que de baixo grau.^[89] De facto, já em 1978 Jacque *et al* associaram baixos níveis de GFAP com sinais de malignidade, tais como mitoses e células gigantes e atípicas, e, contrariamente, níveis elevados de GFAP com a presença de astrócitos bem preservados.^[90] *In vitro*, foi também associada a expressão reduzida de GFAP em algumas linhagens celulares de glioblastomas com a maior agressividade e potencial de invasão tumorais.^[91,92,93]

Tendo em conta o anteriormente referido, os resultados obtidos no presente estudo vão de encontro ao estabelecido na literatura.

4. A marcação de GFAP aumenta progressivamente da zona normal para a zona tumoral em todos os graus de malignidade tumoral

Quando analisadas as três zonas em estudo, a marcação pelo GFAP aumenta progressivamente, de acordo com o esperado, da ZN para a T, em todos os graus tumorais (figura 12 a-c). Tal como referido anteriormente, o processo de gliose reativa, que assinala a ZT selecionada na amostragem, é caracterizado por hipertrofia e proliferação astrocitárias, acompanhadas por produção aumentada de GFAP, tanto nos astrócitos protoplasmáticos como nos fibrosos. ^[50,53] A relação entre o número de células marcadas na ZN e na tumoral, é referida, nomeadamente, por Abaza *et al*, após estudos com imunofluorescência em cortes de congelação e radioimunoensaio, reforçando o facto de existirem níveis elevados de GFAP nos gliomas, e, consideravelmente mais reduzidos, em tecido nervoso normal. ^[94]

5. As diferenças entre graus de malignidade tumoral, dois a dois, aparentam ser mais estatisticamente significativas na zona normal e de transição, e de grau I para grau II de anaplasia, para os 3 acs

Quando feita uma comparação entre graus de malignidade tumoral, dois a dois, verifica-se que a T dos astrocitomas é a que menos apresenta diferenças estatisticamente significativas entre qualquer um dos graus, e que o computador, especialmente para o ac GFAP, parece ser mais sensível para discriminar diferenças do que a avaliação por parte dos restantes avaliadores.

No que diz respeito, especificamente, ao GFAP, as diferenças apresentam-se

estatisticamente significativas entre astrocitomas de baixo grau, mas não entre alto grau, nem entre grau II e III. Estas foram detectadas unicamente pelo computador, pelo que poderá denotar-se uma sensibilidade acrescida do mesmo para diferenciar os vários casos. Tanto de grau I para III, como de I para II, há diferenças nas ZN e ZT, sendo que as diferenças para ZN comp aparentam ser ainda mais notórias, já que foram as únicas verificadas entre grau II e IV. Desta forma, as diferenças para a T só se fazem notar de forma estatisticamente significativa de I para IV, pelo que o decréscimo de marcação IHQ anteriormente referida para esta zona aparenta ser mais ténue do que para as ZN e ZT.

Quanto a NeuN, o número de casos com diferenças estatisticamente significativas, decorrentes da comparação entre astrocitomas de baixo e alto grau, não é tão elevado quanto para GFAP. De qualquer forma, são igualmente mais notórias entre grau I e II, pelo que o aumento da marcação IHQ, proporcional ao grau de malignidade tumoral, e reportado anteriormente, fazer-se-á sentir de forma mais proeminente entre astrocitomas de baixo grau. As diferenças existentes são na sua grande maioria no padrão citoplasmático, e também nas ZN e ZT, especialmente C/ZT, já que é a única zona que apresenta diferenças entre grau I e III, bem como de forma constante ao longo das comparações realizadas. A marcação nuclear que caracteriza este ac varia, assim, de forma não estatisticamente significativa entre os vários graus de malignidade tumoral, exceção para a ZT, entre grau I e IV, e para a ZN e ZT (avaliação pelo computador) de grau I para II.

Por fim, as diferenças registadas para o PGP restringem-se quase exclusivamente às ZN e ZT, tal como se verifica para GFAP e NeuN, pelo que a T apresenta um acréscimo do número de células marcadas de grau I para IV não estatisticamente significativo. Tal como para GFAP, não existem diferenças entre astrocitomas de alto grau, mas sim entre os de baixo grau. A comparação entre os graus I e III e entre I e IV, revela um número de diferenças

estatisticamente significativas igual, embora um dos valores se altere, passando a apresentá-las (PGP/N/T). É o único ac que apresenta diferenças entre II e III, que se restringe apenas à ZT, sendo esta zona também a única abrangida nas diferenças entre os graus II e IV, predileção espelhada pelo ac NeuN.

6. A comparação entre os casos controlos e os astrocitomas, como um todo, revelam um maior número de diferenças não estatisticamente significativas para a zona normal

Quando comparados os casos controlo com os astrocitomas, ambos como um todo, seria de esperar que, para a maioria das zonas e dos acs, se verificassem diferenças estatisticamente significativas, já que a marcação IHQ nos astrocitomas tenderia a abranger um maior número de células. Tal verificou-se, apesar da possibilidade de uma sensibilidade ou precisão acrescidas por parte da avaliação pelo computador ter sido eliminada. A ZN tendeu a apresentar um menor número de diferenças estatisticamente significativas, comparativamente às restantes zonas, sendo que apenas dois dos seis casos que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas correspondiam à zona T.

Os três acs apresentaram casos com valores de $p > 0.05$. Um deles foi GFAP/N/comp. A GFAP estará presente em muito maior quantidade na área astrocitária do que no conjunto dos controlos, os quais integram as metástases, que não apresentam qualquer marcação (com as exceções já referidas), e os schwannomas, que denotaram uma marcação inconstante. No entanto, pelo facto da ZN incluir igualmente os casos de epilepsia, os quais têm, como vimos, valores próximos do máximo avaliativo, o conjunto dos valores apresentados pelos controlos poderá fazer com que, apesar de haver diferenças, elas não sejam significativas. Quando analisados os dados com mais minúcia, por comparação dos controlos com cada grau de

astrocitoma individualmente, verificamos que esta diferença não significativa não abrange todos os graus tumorais, mas apenas os de II e III, e que existem, ainda, diferenças não estatisticamente significativas para GFAP/C/N, embora apenas nos controlos vs astrocitomas I e IV. Estas últimas constatações não conseguimos, para já, explicar através da consulta de literatura.

No que diz respeito ao NeuN, tanto NeuN/N/comp como NeuN/T/comp não apresentaram diferenças significativas. Como sabemos, não há marcação por parte deste ac, nem nos schwannomas nem nas metástases, apesar da mesma, para os casos controlo de epilepsia, ser próxima do máximo avaliativo. Assim, tal como se verificou para o GFAP, embora neste caso só extensível para controlos vs astrocitomas grau II, a avaliação da ZN pelo computador poderá ter voltado a não demonstrar diferenças pela mesma razão. Quanto à T, seria expectável existirem diferenças, embora o computador não as tenha detectado, para nenhum dos graus tumorais, anulando a teoria da sensibilidade avaliativa acrescida do mesmo.

O PGP foi o que apresentou mais casos com valores de $p > 0.05$ - PGP/N/N, PGP/C/N e PGP/T/comp, extensíveis a todos os graus tumorais. Pelo verificado anteriormente, a marcação nos astrocitomas, bem como nos schwannomas, para este ac, foi relativamente inconstante, pelo que poderão, de facto, ser demonstradas menos diferenças no que diz respeito à componente tumoral. A razão levantada para justificar a ausência de diferenças estatisticamente significativas para a ZN é extensível ao referido para os acs anteriores. Tanto PGP/N/T e C/ZT para o grau I, como PGP/C/T para os graus I e III não apresentaram diferenças significativas.

7. Comparação entre zona normal e casos de epilepsia, zona tumoral e metástases, e entre schwannomas e as três zonas em estudo

Após a comparação entre os casos controlo de epilepsia e os vários graus de astrocitoma, seria expectável que, para GFAP, tendo em conta que a marcação diminui com o grau tumoral, as diferenças se revelassem mais significativas na mesma direção, e que o contrário se tendesse a verificar para NeuN e PGP. GFAP/C/N, apenas para o grau IV, obteve diferenças significativas, o que vai ao encontro do que foi referido, tendência seguida pela avaliação do computador. No entanto, para o grau I ocorreram igualmente diferenças. Já para NeuN, verificou-se a tendência esperada no caso de NeuN/C/N, embora para NeuN/N/comp, e especialmente para NeuN/N/N, o mesmo não se tenha verificado. Para PGP, no caso da marcação nuclear na ZN, houve a tendência expectável, embora PGP/C/N e PGP/N/comp tenham apresentado valores inferiores a 0.05 nos quatro tipos de astrocitomas.

Quando comparada a ZN com os casos de metástases, esperar-se-iam diferenças que abrangessem todos os acs e graus tumorais já que a marcação dos casos controlos é praticamente nula. No entanto, os valores de significância estatística tenderam a aumentar com o grau tumoral para GFAP, e a decrescer para NeuN e PGP, expondo uma tendência contrária à comparação anterior. Para GFAP existiram, de facto, diferenças para todos os critérios avaliativos. Já NeuN apresentou a tendência esperada para NeuN/N/T, mas não na avaliação por parte do computador. Este desvirtuamento relativamente ao esperado também se verificou para PGP.

Todos os casos de schwannomas, como foi referido anteriormente, apresentaram uma marcação bastante inconstante para os acs GFAP e PGP, e nenhuma para NeuN. Através desta comparação verificou-se que existiram maioritariamente diferenças estatisticamente

significativas para todos os aspetos avaliativos, com algumas exceções, nomeadamente para NeuN. No entanto, verificou-se, de facto, uma heterogeneidade de resultados, dificultando a ilação de um binómio comum ao que foi apresentado.

VI. Limitações do estudo

São várias as limitações do presente estudo. Em primeiro lugar, o número relativamente reduzido de casos em análise, pelo que seriam necessários estudos posteriores como uma amostragem de doentes maior. Em segundo lugar, não existe certeza quanto à natureza do parênquima tecidular das ZN e de transição dos casos de astrocitoma, e, portanto, se a diminuição ou ausência do número de neurónios marcados, que se verificou, será real (tratando-se de substância cinzenta), ou se corresponderá apenas à ausência natural dos mesmos na substância branca. Tal como foi referido na metodologia, decorrente da necessidade de obtermos células astrocitárias normais para os casos controlo, foram seleccionados casos de cirurgia de epilepsia, com patologia não tumoral. No entanto, não temos certeza de que a análise terá sido suficientemente afastada da lesão, e que, portanto, o tecido seja completamente normal.

Quanto à técnica IHQ, apesar de ter sido realizada de forma bastante meticulosa e padronizada, devido ao elevado número de lâminas histológicas, estas não foram sujeitas à técnica no mesmo tempo. Assim, existe alguma variabilidade inerente à técnica manual, a qual seria suplantada pela utilização de aparelhos automáticos de IHQ. Esta variabilidade é extensível às condições de fixação dos tecidos em estudo, as quais terão sido, à partida, adequadas. É ainda de referir o viés intrínseco à avaliação microscópica por avaliadores distintos, embora a mesma tenha sido realizada por duas pessoas, isoladamente, e um programa de *software*, por forma a tornar os resultados fidedignos e reproduzíveis.

Por fim, seria ainda útil, em estudos futuros, a análise emparelhada das três zonas (ZN, ZT e T), especialmente nos sete casos de astrocitomas com marcação de PGP em elementos não neuronais; a utilização de microscopia confocal, com marcações duplas, e a

utilização do ac Nestina, por forma a definir de forma mais detalhada a origem embrionária destas células marcadas com PGP.

VII. Conclusão

Pode admitir-se que os objetivos propostos foram alcançados.

Os resultados foram, de uma forma geral, consistentes com os citados na literatura. A marcação da PGP andou a par com a marcação de NeuN, e em oposição à da GFAP, aumentando proporcionalmente com o grau de anaplasia tumoral, para todas as zonas, e diminuindo da ZN para T. Estas diferenças foram mais acentuadas entre grau I e II, e, no caso da PGP, na ZT.

Apesar de, tal como na marcação pelo NeuN, não ter sido evidenciada marcação na região tumoral da maioria dos casos analisados, excetuando casos de neurónios “aprisionados” e de axónios arrastados, foram descritos sete casos de marcação clara e abundante de gliofilamentos e outros elementos de natureza glial pela PGP, assim como elementos estromais do tumor, em que a marcação de NeuN correspondente era nula. Não houve predileção por sexo ou idade, embora a maioria destes casos correspondesse a astrocitomas de grau I.

A sobre-expressão da PGP levanta a hipótese de uma possível ação da mesma na supressão ou progressão tumorais, ou, tal como sugerido por Giambanco *et al* ^[49] um papel importante, quer nas células gliais normais durante o desenvolvimento cerebral, quer na gliose

reativa ou na tumorigénese da linhagem glial. A marcação apresentada revela, ainda, a possível utilidade da proteína na marcação de tumores mistos, glioneuronais.

Há ainda muito por investigar no que concerne à importância da PGP nas células astrocíticas, quer normais, reativas ou tumorais. Cremos que o presente estudo, e outros, futuramente, poderão constituir, no entanto, um avanço relevante na sua caracterização, potenciando a delimitação de diagnósticos de neoplasias gliais, neuronais ou mistas, mais fiáveis e reprodutíveis na prática diária da neuropatologia.

VIII. Apêndices

1. Apêndice I: Informação clínica dos casos seleccionados para o estudo

| Número histológico | Idade | Género | Localização | Diagnóstico |
|--------------------|-------|--------|----------------|----------------------|
| Caso 1 | 47 | F | Frontal | Astrocitoma grau II |
| Caso 2 | 56 | F | Frontal | Glioblastoma |
| Caso 3 | 45 | M | Frontal | Glioblastoma |
| Caso 4 | 60 | F | Extramedular | Schwanoma |
| Caso 5 | 67 | M | Parietal | Glioblastoma |
| Caso 6 | 73 | M | Temporal | Glioblastoma |
| Caso 7 | 65 | M | Occipital | Glioblastoma |
| Caso 8 | 27 | M | Frontal | Glioblastoma |
| Caso 9 | 59 | F | Corpo caloso | Astrocitoma grau II |
| Caso 10 | 44 | M | Temporal | Glioblastoma |
| Caso 11 | 82 | M | Cerebelar | Glioblastoma |
| Caso 12 | 51 | F | Lombar | Schwanoma |
| Caso 13 | 73 | M | Dorsal | Schwanoma |
| Caso 14 | 66 | M | < p.c. | Schwanoma |
| Caso 15 | 64 | M | Dorsal | Schwanoma |
| Caso 16 | 35 | M | III ventrículo | Schwanoma |
| Caso 17 | 41 | F | Lombar | Schwanoma |
| Caso 18 | 33 | M | Temporal | Astrocitoma grau II |
| Caso 19 | 63 | F | Temporal | Schwanoma |
| Caso 20 | 38 | M | Frontal | Astrocitoma grau III |
| Caso 21 | 64 | M | Temporal | Gioblastoma |
| Caso 22 | 37 | M | < p.c. | Schwanoma |
| Caso 23 | 71 | F | Temporal | Glioblastoma |
| Caso 24 | 44 | F | Extra-axial | Schwanoma |
| Caso 25 | 36 | M | Hipocampo | Esclerose mesial |

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA

CARACTERIZAÇÃO DA MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA *PROTEIN GENE PRODUCT 9.5* (PGP 9.5) EM

CÉLULAS ASTROCITÁRIAS

| | | | | |
|----------------|----|---|-----------------------|----------------------|
| Caso 26 | 12 | F | Parietal | Astrocitoma grau II |
| Caso 27 | 39 | F | Hipocampo | Esclerose mesial |
| Caso 28 | 16 | F | Occipital | Astrocitoma grau I |
| Caso 29 | 35 | M | Cerebelar | Astrocitoma grau I |
| Caso 30 | 47 | F | Frontal | Astrocitoma grau III |
| Caso 31 | 13 | M | Parietal | Astrocitoma grau I |
| Caso 32 | 60 | F | Cerebelar | Metástase Mama |
| Caso 33 | 46 | M | Temporal | Astrocitoma grau II |
| Caso 34 | 62 | M | Parietal | Metástase Pulmão |
| Caso 35 | 70 | M | Frontal | Metástase Pulmão |
| Caso 36 | 3 | F | Cerebelar | Astrocitoma grau I |
| Caso 37 | 40 | F | Temporal | Metástase Mama |
| Caso 38 | 52 | M | Frontal | Metástase Pulmão |
| Caso 39 | 55 | F | Medular | Metástase Mama |
| Caso 40 | 71 | F | Cerebelar | Metástase Mama |
| Caso 41 | 58 | M | Temporal | Astrocitoma grau II |
| Caso 42 | 32 | M | Frontal | Astrocitoma grau III |
| Caso 43 | 32 | F | Hipocampo (gliose) | Esclerose mesial |
| Caso 44 | 37 | F | Hipocampo | Esclerose mesial |
| Caso 45 | 29 | M | Frontal | Astrocitoma grau III |
| Caso 46 | 38 | M | Hipocampo Gliose | Esclerose mesial |
| Caso 47 | 50 | F | Hipocampo | Esclerose mesial |
| Caso 48 | 45 | F | Hipocampo (gliose) | Esclerose mesial |
| Caso 49 | 60 | F | Frontal | Astrocitoma grau III |
| Caso 50 | 17 | F | Frontal | Esclerose mesial |
| Caso 51 | 70 | F | Temporal | Metástase Pulmão |
| Caso 52 | 70 | F | Temporal | Metástase Pulmão |
| Caso 53 | 47 | F | Frontal | Metástase Mama |
| Caso 54 | 12 | M | Cerebelar | Astrocitoma grau I |

| | | | | |
|----------------|----|---|----------------------|----------------------|
| Caso 55 | 25 | F | Cerebelar | Astrocitoma grau I |
| Caso 56 | 46 | F | Hipocampo | Esclerose mesial |
| Caso 57 | 26 | M | Frontal | Astrocitoma grau II |
| Caso 58 | 76 | M | Temporal (gliose) | Esclerose mesial |
| Caso 59 | 11 | M | Cerebelar | Astrocitoma grau I |
| Caso 60 | 42 | M | Parietal | Astrocitoma grau II |
| Caso 61 | 29 | F | Occipital | Astrocitoma grau II |
| Caso 62 | 30 | F | Temporal | Astrocitoma grau III |
| Caso 63 | 26 | F | Temporal | Astrocitoma grau III |
| Caso 64 | 11 | M | Cerebelar | Astrocitoma grau I |
| Caso 65 | 48 | F | Fronto- insular | Astrocitoma grau III |
| Caso 66 | 60 | F | Frontal | Astrocitoma grau III |
| Caso 67 | 41 | M | Parietal | Astrocitoma grau III |
| Caso 68 | 36 | M | Parietal | Astrocitoma grau I |
| Caso 69 | 27 | F | IV ventrículo | Astrocitoma grau I |
| Caso 70 | 34 | F | Temporal | Astrocitoma grau II |

Tabela 2 - Informação clínica dos casos selecionados para o estudo

**2. Apêndice II - Informação acerca dos reagentes utilizados nos
 procedimentos laboratoriais**

| Nome do Reagente | Informação |
|-----------------------------------|---|
| Hematoxilina de Harris | Merck HX388734 1.09253.05 00 500 mL |
| Eosina | Merck Série nº 1345 25g |
| Peróxido de Hidrogénio 30% | Merck 1.07210.0250 K433963410218 250 mL |
| <i>Antigen Unmasking solution</i> | Vector H3300 lote Y0409 250 mL |
| Ac anti-NeuN | Millipore Clone A60 Cat# MAB377 Lote 2279235 500 µg (1 mg/mL) |
| Ac anti-GFAP | Cell Marque Clone G-A-5 Ref 258M-16 Lote 1107503B 1 mL |
| Ac anti-PGP 9.5 | AbD Serotec <i>mouse anti-human protein</i> MCA 2084 |

| | |
|--|-------------------------------------|
| | Clone 10A1 Lote 230211 1 mL |
| Dako RealTM EnvisionTM – HRP Rabbit/Mouse | Ref K5007 Lote 0080066 100 mL |
| Dako RealTM – DAB + Chromogen | Ref K5007 Lote 0080066 5 mL |
| Dako RealTM – Substrate Buffer | Ref K5007 Lote 0080066 250 mL |

Tabela 3 - Informação acerca dos reagentes utilizados nos procedimentos laboratoriais

3. Apêndice III – Grelha de avaliação IHQ

| Nº do caso | Escala nuclear | | | Escala citoplasmática | | |
|------------------|----------------|----|---|-----------------------|----|---|
| | N | ZT | T | N | ZT | T |
| Caso nº1 | | | | | | |
| Caso nº2 | | | | | | |
| Caso nº3 | | | | | | |
| Caso nº4 | | | | | | |
| Caso nº5 | | | | | | |
| Caso nº6 | | | | | | |
| Caso nº7 | | | | | | |
| Caso nº8 | | | | | | |
| Caso nº9 | | | | | | |
| Caso nº10 | | | | | | |

Tabela 4 - Grelha de avaliação IHQ.

4. Apêndice IV – Médias aritméticas das avaliações dos dois avaliadores, e avaliação do sistema informático para todos os casos analisados

| Nº Caso | Diagnóstico | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | R | S | T | U | V | W | X |
|---------|-------------|-----|-----|-----|---|---|---|-----|---|---|-----|---|---|---|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|---|
| Caso 1 | Epilepsia | 4 | | | 2 | | | 4 | | | 3,5 | | | 2 | | | 3,5 | | | 4 | | | 4 | | |
| Caso 2 | Epilepsia | 4 | | | 2 | | | 4 | | | 4 | | | 3 | | | 4 | | | 4 | | | 4 | | |
| Caso 3 | Epilepsia | 4 | | | 2 | | | 4 | | | 4 | | | 2 | | | 4 | | | 4 | | | 3 | | |
| Caso 4 | Epilepsia | 4 | | | 2 | | | 3,5 | | | 4 | | | 1 | | | 2 | | | 4 | | | 4 | | |
| Caso 5 | Epilepsia | 4 | | | 2 | | | 4 | | | 4 | | | 2 | | | 4 | | | 4 | | | 4 | | |
| Caso 6 | Epilepsia | 4 | | | 2 | | | 4 | | | 3 | | | 1 | | | 2 | | | 4 | | | 4 | | |
| Caso 7 | Epilepsia | 4 | | | 3 | | | 4 | | | 4 | | | 2 | | | 4 | | | 4 | | | 4 | | |
| Caso 8 | Epilepsia | 4 | | | 1 | | | 4 | | | 4 | | | 2 | | | 4 | | | 4 | | | 4 | | |
| Caso 9 | Epilepsia | 4 | | | 2 | | | 4 | | | 3,5 | | | 2 | | | 4 | | | 4 | | | 3 | | |
| Caso 10 | Epilepsia | 4 | | | 2 | | | 4 | | | 4 | | | 2 | | | 2 | | | 4 | | | 4 | | |
| Caso 11 | Metástase | | | 0 | | | 1 | | | 0 | | | | | | 3 | | | 0 | | | 1 | | | 0 |
| Caso 12 | Metástase | | | 0 | | | 0 | | | 0 | | | | | | 0 | | | 2,5 | | | 4 | | | 2 |
| Caso 13 | Metástase | | | 0 | | | 0 | | | 0 | | | | | | 0 | | | 2 | | | 2,5 | | | 1 |
| Caso 14 | Metástase | | | 0 | | | 0 | | | 0 | | | | | | 0 | | | 0 | | | 0 | | | 0 |
| Caso 15 | Metástase | | | 0 | | | 0 | | | 0 | | | | | | 0 | | | 0,5 | | | 1,5 | | | 0 |
| Caso 16 | Metástase | | | 0 | | | 0 | | | 0 | | | | | | 0 | | | 0,5 | | | 2 | | | 0 |
| Caso 17 | Metástase | | | 0 | | | 0 | | | 0 | | | | | | 2 | | | 0 | | | 0 | | | 0 |
| Caso 18 | Metástase | | | 0 | | | 0 | | | 0 | | | | | | 0 | | | 0 | | | 0 | | | 0 |
| Caso 19 | Metástase | | | 0 | | | 0 | | | 0 | | | | | | 0 | | | 0 | | | 0 | | | 0 |
| Caso 20 | Metástase | | | 0 | | | 0 | | | 0 | | | | | | 0 | | | 1 | | | 1 | | | 0 |
| Caso 21 | Schwanoma | 1 | 1 | 1 | | | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | 0 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 2 | 2 | 2 | | | 0 |
| Caso 22 | Schwanoma | 3,5 | 3,5 | 3,5 | | | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | 0 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | | | 1 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|-----------|-----|-----|-----|---|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|---|
| Caso 23 | Schwanoma | 2,5 | 2,5 | 2,5 | | | 1 | 0 | 0 | 0 | | | | | | 0 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | | | 0 |
| Caso 24 | Schwanoma | 0 | 0 | 0 | | | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | 0 |
| Caso 25 | Schwanoma | 3,5 | 3,5 | 3,5 | | | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | 0 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | | | 0 |
| Caso 26 | Schwanoma | 0 | 0 | 0 | | | 2 | 0 | 0 | 0 | | | | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | 3 |
| Caso 27 | Schwanoma | 1 | 1 | 1 | | | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | 0 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | | | 0 |
| Caso 28 | Schwanoma | 3,5 | 3,5 | 3,5 | | | 3 | 0 | 0 | 0 | | | | | | 0 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | | | 1 |
| Caso 29 | Schwanoma | 0 | 0 | 0 | | | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | 0 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | | | 0 |
| Caso 30 | Schwanoma | 0 | 0 | 0 | | | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | 0 | 1 | 1 | 1 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | | | 2 |
| Caso 31 | Astro I | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 2 | 4 | 3 | 4 | 1 | 0 | 3 | 0,5 | 0 | 1 | 0 | 0 | 4 | 2 | 2,5 | 4 | 2 | 2,5 | 2 | 0 | 1 |
| Caso 32 | Astro I | 3 | 3 | 3,5 | 3 | 3 | 2 | 4 | 3,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 2 | 0 | 2 | 0,5 | 0,5 | 3 | 1,5 | 0,5 | 2 | 0 | 0 |
| Caso 33 | Astro I | 4 | 3,5 | 3,5 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 1,5 | 2 | 4 | 3,5 | 2,5 | 3 | 1 | 1 |
| Caso 34 | Astro I | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 2 | 0,5 | 2 | 4 | 1,5 | 2,5 | 1 | 0 | 2 |
| Caso 35 | Astro I | 4 | 3,5 | 3,5 | 3 | 4 | 3 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 2 | 2,5 | 1,5 | 3 | 2,5 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| Caso 36 | Astro I | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,5 | 1,5 | 0 | 0 | 0 |
| Caso 37 | Astro I | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 3 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1,5 | 0 | 2 | 2,5 | 0 | 1 | 1 |
| Caso 38 | Astro I | 4 | 4 | 4 | 2 | 4 | 3 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 1,5 | 0,5 | 0 | 0 | 0 |
| Caso 39 | Astro I | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0,5 | 0,5 | 0 | 1,5 | 1,5 | 0,5 | 0 | 1 | 0 |
| Caso 40 | Astro I | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2,5 | 2,5 | 1 | 2 | 2 | 1,5 | 3 | 2 | 2 | 1 | 0,5 | 0,5 | 2 | 1,5 | 0,5 | 0 | 1 | 0 |
| Caso 41 | Astro II | 4 | 3,5 | 4 | 2 | 2 | 2 | 4 | 4 | 2,5 | 4 | 3,5 | 2,5 | 3 | 0 | 2 | 3,5 | 3,5 | 0,5 | 4 | 4 | 2 | 4 | 3 | 2 |
| Caso 42 | Astro II | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 4 | 3 | 2,5 | 2 | 1 | 0 |
| Caso 43 | Astro II | 3 | 2,5 | 4 | 2 | 1 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0,5 | 0 | 3,5 | 1,5 | 1 | 3 | 0 | 2 |
| Caso 44 | Astro II | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 0,5 | 0,5 | 1 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0,5 | 0,5 | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0 | 0 |
| Caso 45 | Astro II | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 2 | 3 | 3 | 4 | 3,5 | 1 | 2 | 1,5 | 1 | 2 | 0 | 0 | 3 | 1 | 2,5 | 3 | 1 | 2 | 3 | 0 | 0 |
| Caso 46 | Astro II | 4 | 3,5 | 2,5 | 2 | 2 | 0 | 4 | 2 | 2,5 | 2 | 1 | 0,5 | 1 | 0 | 0 | 0,5 | 3 | 4 | 1,5 | 3 | 4 | 2 | 2 | 2 |
| Caso 47 | Astro II | 3,5 | 2,5 | 2,5 | 2 | 2 | 3 | 4 | 1,5 | 0 | 2 | 0,5 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0,5 | 1,5 | 4 | 2 | 2,5 | 3 | 2 | 1 |
| Caso 48 | Astro II | 4 | 4 | 4 | 2 | 3 | 3 | 4 | 4 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3,5 | 2 | 2,5 | 4 | 2,5 | 1,5 | 3 | 4 | 3 |
| Caso 49 | Astro II | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 4 | 3,5 | 1 | 2 | 1,5 | 0,5 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 2 | 1 | 3 | 1 | 4 | 3 | 2 |
| Caso 50 | Astro II | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 3 | 3,5 | 3,5 | 2,5 | 2 | 2 | 1,5 | 2 | 0 | 0 | 3,5 | 2 | 3 | 4 | 4 | 3,5 | 3 | 1 | 0 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|-----------|-----|-----|-----|---|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|---|
| Caso 51 | Astro II | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 3 | 4 | 3 | 1,5 | 2 | 1 | 0,5 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2,5 | 2 | 3,5 | 2,5 | 2,5 | 3 | 3 | 0 |
| Caso 52 | Astro II | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 4 | 3 | 1,5 | 2 | 1 | 0,5 | 1 | 0 | 0 | 1 | 3 | 1 | 1,5 | 3,5 | 2 | 3 | 3 | 0 |
| Caso 53 | Astro II | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 3 | 3,5 | 2 | 1,5 | 1,5 | 1 | 0,5 | 2 | 0 | 0 | 3,5 | 2,5 | 2 | 4 | 3 | 2 | 3 | 2 | 1 |
| Caso 54 | Astro III | 4 | 4 | 3,5 | 2 | 2 | 2 | 4 | 3,5 | 0 | 2 | 1,5 | 0 | 2 | 1 | 0 | 3,5 | 3 | 0,5 | 4 | 3 | 1,5 | 4 | 3 | 0 |
| Caso 55 | Astro III | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 3 | 4 | 3,5 | 1,5 | 2 | 1,5 | 0,5 | 2 | 2 | 0 | 4 | 3 | 1,5 | 4 | 3 | 1,5 | 4 | 4 | 1 |
| Caso 56 | Astro III | 4 | 2,5 | 2,5 | 2 | 3 | 2 | 4 | 3,5 | 1,5 | 2 | 1,5 | 0,5 | 2 | 0 | 0 | 4 | 2,5 | 2 | 4 | 3,5 | 2 | 4 | 4 | 1 |
| Caso 57 | Astro III | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 3,5 | 2 | 3 | 3 | 2 | 4 | 4 | 1 |
| Caso 58 | Astro III | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 3 | 2,5 | 3,5 | 1,5 | 0,5 | 1,5 | 0,5 | 1 | 1 | 0 | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 4 | 3,5 | 3,5 | 3 | 3 | 2 |
| Caso 59 | Astro III | 4 | 3,5 | 3,5 | 0 | 3 | 3 | 3,5 | 3,5 | 2 | 2 | 1,5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 1,5 | 3 | 2 | 1,5 | 3 | 2 | 0 |
| Caso 60 | Astro III | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1,5 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0,5 | 3,5 | 2 | 0,5 | 3 | 2 | 0 |
| Caso 61 | Astro III | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 4 | 3,5 | 0 | 2 | 1,5 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 | 1,5 | 1,5 | 3 | 1,5 | 1,5 | 1 | 4 | 0 |
| Caso 62 | Astro III | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 4 | 3,5 | 3 | 2 | 1,5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 3,5 | 3,5 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| Caso 63 | Astro III | 4 | 3 | 2,5 | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1,5 | 1 | 4 | 2,5 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Caso 64 | Astro III | 4 | 4 | 4 | | 3 | 4 | | | | 0,5 | 0,5 | 0,5 | | 1 | 4 | | 2 | 1,5 | | 2,5 | 1,5 | | 3 | 0 |
| Caso 65 | Astro III | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 4 | 3,5 | 0,5 | 2 | 1,5 | 0,5 | 2 | 1 | 0 | 0,5 | 1 | 1 | 1,5 | 2 | 2 | 1 | 2 | 0 |
| Caso 66 | Astro III | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 0 | 2 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 | 2 | 0,5 | 3,5 | 2,5 | 0,5 | 1 | 2 | 0 |
| Caso 67 | Astro IV | 4 | 4 | 4 | 1 | 3 | 3 | 3 | 2,5 | 2,5 | 4 | 3,5 | 2,5 | 2 | 3 | 3 | 3,5 | 2,5 | 1,5 | 3,5 | 3 | 1,5 | 3 | 3 | 2 |
| Caso 68 | Astro IV | 4 | 4 | 4 | 1 | 1 | 3 | 3,5 | 3 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 0 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 4 | 3,5 | 1 | 4 | 3 | 0 |
| Caso 69 | Astro IV | 3,5 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 4 | 3,5 | 0 | 4 | 3 | 1 | 3 | 1 | 0 | 2,5 | 2 | 2 | 2,5 | 2 | 2 | 3 | 3 | 1 |
| Caso 70 | Astro IV | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 1 | 2 | 2 | 4 | 3,5 | 0 | 4 | 3,5 | 0 | 1 | 1 | 0 | 3 | 3 | 1,5 | 3 | 3 | 1,5 | 1 | 2 | 0 |
| Caso 71 | Astro IV | 4 | 4 | 4 | 1 | 1 | 1 | 3,5 | 4 | 0,5 | 4 | 4 | 1,5 | 2 | 2 | 0 | 2 | 3,5 | 3,5 | 2,5 | 3,5 | 4 | 4 | 3 | 2 |
| Caso 72 | Astro IV | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 1 | 3,5 | 3 | 0 | 3,5 | 3 | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1,5 | 1 | 3 | 0 |
| Caso 73 | Astro IV | 3 | 3 | 4 | 1 | 2 | 2 | 3,5 | 2,5 | 1 | 3,5 | 2,5 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3,5 | 3 | 2 | 4 | 3 | 2,5 | 4 | 2 | 3 |
| Caso 74 | Astro IV | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 1 | 2 | 2 | 4 | 4 | 0 | 4 | 4 | 1 | 2 | 0 | 0 | 4 | 3 | 2 | 4 | 3,5 | 2 | 3 | 3 | 1 |
| Caso 75 | Astro IV | 3 | 3,5 | 3,5 | 2 | 2 | 3 | 3,5 | 3 | 2 | 1,5 | 1 | 0 | 4 | 1 | 0 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 |
| Caso 76 | Astro IV | 3 | 3,5 | 4 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3,5 | 1,5 | 3,5 | 3,5 | 1,5 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 2,5 | 3 | 3 | 2,5 | 3 | 2 | 1 |
| Caso 77 | Astro IV | 3,5 | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 | 4 | 3,5 | 3 | 4 | 3,5 | 3 | 3 | 1 | 0 | 4 | 3,5 | 2,5 | 4 | 3,5 | 2 | 4 | 4 | 1 |

Tabela 5 - Médias aritméticas das avaliações dos dois avaliadores, e avaliação do sistema informático para todos os casos analisados. A - GFAP/C/N, B - GFAP/C/ZT, C - GFAP/C/T, D - GFAP/N/comp, E - GFAP/ZT/comp, F - GFAP/T/comp, G - NeuN/N/N, H - NeuN/N/ZT, I - NeuN/N/T, J - NeuN/C/N, K - NeuN/C/ZT ; L - NeuN/C/T, M - NeuN/N/comp, N - NeuN/ZT/comp, O - NeuN/T/comp, P - PGP/N/N, Q - PGP/N/ZT, R - PGP/N/T, S - PGP/C/N, T - PGP/C/ZT, U - PGP/C/T, V - PGP/N/comp, W - PGP/ZT/comp, X - PGP/T/comp. A avaliação da marcação nuclear para a GFAP foi nula, razão pela qual não se encontra na tabela.

5. Apêndice V – Médias ponderadas das avaliações IHQs dos astrocitomas

| Ac's e zonas | Astrocitomas grau I | Astrocitomas grau II | Astrocitomas grau III | Astrocitomas grau IV |
|---------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| GFAP/C/N | 3,850 | 3,846 | 3,885 | 3,545 |
| GFAP/C/ZT | 3,750 | 3,654 | 3,654 | 3,636 |
| GFAP/C/T | 3,800 | 3,731 | 3,577 | 3,773 |
| GFAP/N/comp | 2,900 | 2,154 | 1,917 | 1,455 |
| GFAP/ZT/comp | 3,400 | 2,231 | 2,308 | 2,091 |
| GFAP/T/comp | 3,000 | 2,538 | 2,538 | 2,182 |
| NeuN/N/N | 2,950 | 3,038 | 2,917 | 3,591 |
| NeuN/N/ZT | 1,550 | 2,346 | 2,625 | 3,273 |
| NeuN/N/T | 0,500 | 1,231 | 0,833 | 1,182 |
| NeuN/C/N | 0,700 | 1,692 | 1,385 | 3,500 |
| NeuN/C/ZT | 0,350 | 1,192 | 1,115 | 3,091 |
| NeuN/C/T | 0,200 | 0,577 | 0,346 | 1,273 |
| NeuN/N/comp | 2,400 | 1,000 | 1,250 | 1,818 |
| NeuN/ZT/comp | 0,900 | 0,154 | 0,615 | 1,091 |
| NeuN/T/comp | 0,200 | 0,154 | 0,308 | 0,545 |
| PGP/N/N | 1,500 | 2,500 | 2,750 | 2,773 |
| PGP/N/ZT | 1,000 | 1,923 | 2,231 | 2,773 |
| PGP/N/T | 1,150 | 1,731 | 1,423 | 1,955 |
| PGP/C/N | 2,200 | 3,077 | 3,417 | 3,045 |
| PGP/C/ZT | 1,800 | 2,577 | 2,654 | 2,909 |
| PGP/C/T | 1,550 | 2,077 | 1,769 | 2,045 |
| PGP/N/comp | 0,900 | 2,769 | 2,750 | 2,909 |
| PGP/ZT/comp | 0,400 | 1,846 | 2,923 | 2,818 |
| PGP/T/comp | 0,500 | 1,000 | 0,692 | 1,182 |

Tabela 6 - Médias ponderadas das avaliações IHQs dos astrocitomas.

**6. Apêndice VI – Médias ponderadas das avaliações IHQs dos astrocitomas,
 para cada zona e ac**

| Ac's e zonas | Astrocitomas grau I | Astrocitomas Grau II | Astrocitomas grau III | Astrocitomas grau IV |
|----------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| GFAP/N | 3,375 | 3,000 | 2,901 | 2,500 |
| GFAP/ZT | 3,575 | 2,942 | 2,981 | 2,864 |
| GFAP/T | 3,400 | 3,135 | 3,058 | 2,977 |
| NeuN/N | 2,017 | 1,910 | 1,850 | 2,970 |
| NeuN/ZT | 0,933 | 1,231 | 1,452 | 2,485 |
| NeuN/T | 0,300 | 0,654 | 0,496 | 1,000 |
| PGP/N | 1,533 | 2,782 | 2,972 | 2,909 |
| PGP/ZT | 1,067 | 2,115 | 2,603 | 2,833 |
| PGP/T | 1,067 | 1,603 | 1,295 | 1,727 |

Tabela 7 - Médias ponderadas das avaliações IHQs dos astrocitomas, para cada zona e ac.

**7. Apêndice VII – Médias ponderadas das avaliações IHQs dos astrocitomas,
 para zonas citoplasmática e nuclear**

| Ac's e zonas | Astrocitomas grau I | Astrocitomas grau II | Astrocitomas grau III | Astrocitomas grau IV |
|-----------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| GFAP/C/N | 3,800 | 3,744 | 3,705 | 3,652 |
| NeuN/N | 1,667 | 2,205 | 2,125 | 2,682 |
| NeuN/C | 0,417 | 1,154 | 0,949 | 2,621 |
| PGP/N | 1,217 | 2,051 | 2,135 | 2,500 |
| PGP/C | 1,850 | 2,577 | 2,613 | 2,667 |

Tabela 8 - Médias ponderadas das avaliações IHQs dos astrocitomas, para zonas citoplasmática e nuclear.

8. Apêndice VIII – Valores de significância estatística para astrocitomas vs controles

| Ac's e zonas | Valor P |
|--------------------|---------|
| GFAP/C/N | 0,000 |
| GFAP/C/ZT | 0,000 |
| GFAP/C/T | 0,000 |
| GFAP/N/comp | 0,645 |
| GFAP/T/comp | 0,000 |
| NeuN/N/N | 0,010 |
| NeuN/N/ZT | 0,000 |
| NeuN/N/T | 0,000 |
| NeuN/C/N | 0,000 |
| NeuN/N/comp | 0,435 |
| NeuN/T/comp | 0,829 |
| PGP/N/N | 0,159 |
| PGP/N/ZT | 0,000 |
| PGP/N/T | 0,000 |
| PGP/C/N | 0,401 |
| PGP/C/ZT | 0,003 |
| PGP/C/T | 0,042 |
| PGP/N/comp | 0,002 |
| PGP/T/comp | 0,153 |

Tabela 9 – Valores de significância estatística para astrocitomas vs controles

9. Apêndice IX – Valores de significância estatística para epilepsia vs zona normal dos astrocitomas

| Ac's e zonas | Epilepsia vs Astrocitomas s grau I | Epilepsia vs Astrocitomas grau II | Epilepsia vs Astrocitomas grau III | Epilepsia vs Astrocitomas grau IV |
|--------------------|--|---|--|---|
| GFAP/C/N | 0,177 | 0,140 | 0,337 | 0,003 |
| GFAP/N/comp | 0,001 | 0,409 | 0,764 | 0,022 |
| NeuN/N/N | 0,071 | 0,098 | 0,046 | 0,011 |
| NeuN/C/N | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,280 |
| NeuN/N/comp | 0,392 | 0,027 | 0,056 | 0,852 |
| PGP/N/N | 0,002 | 0,050 | 0,175 | 0,222 |
| PGP/C/N | 0,003 | 0,020 | 0,021 | 0,007 |
| PGP/N/comp | 0,000 | 0,004 | 0,017 | 0,031 |

Tabela 10 – Valores de significância estatística para epilepsia vs zona normal dos astrocitomas

10. Apêndice X – Valores de significância estatística para metástases vs zona tumoral dos astrocitomas

| Ac's e zonas | Metástases vs Astrocitomas grau I | Metástases vs Astrocitomas grau II | Metástases vs Astrocitomas grau III | Metástases vs Astrocitomas grau IV |
|--------------------|---|--|---|--|
| GFAP/C/T | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| GFAP/T/comp | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| NeuN/N/T | 0,079 | 0,000 | 0,019 | 0,005 |
| NeuN/T/comp | 0,461 | 0,328 | 0,680 | 0,929 |
| PGP/N/T | 0,222 | 0,019 | 0,049 | 0,002 |
| PGP/C/T | 0,510 | 0,100 | 0,257 | 0,103 |
| PGP/T/comp | 0,526 | 0,087 | 0,232 | 0,027 |

Tabela 11 – Valores de significância estatística para metástases vs zona tumoral dos astrocitomas

**11. Apêndice XI – Valores de significância estatística para schwannomas vs
 astrocitomas**

| Ac's e zonas | Schwannomas vs Astrocitomas grau I | Schwannomas vs Astrocitomas grau II | Schwannomas vs Astrocitomas grau III | Schwannomas vs Astrocitomas grau IV |
|--------------------|--|---|--|---|
| GFAP/C/N | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,001 |
| GFAP/C/ZT | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| GFAP/C/T | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| GFAP/T/comp | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,001 |
| NeuN/N/N | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| NeuN/N/ZT | 0,002 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| NeuN/N/T | 0,079 | 0,000 | 0,019 | 0,005 |
| NeuN/T/comp | | 0,337 | 0,337 | 0,172 |
| PGP/N/N | 0,025 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| PGP/N/ZT | 0,043 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| PGP/N/T | 0,024 | 0,002 | 0,001 | 0,000 |
| PGP/C/N | 0,169 | 0,001 | 0,000 | 0,001 |
| PGP/C/ZT | 0,254 | 0,008 | 0,002 | 0,000 |
| PGP/C/T | 0,064 | 0,081 | 0,272 | 0,080 |
| PGP/T/comp | 0,331 | 0,512 | 0,985 | 0,295 |

Tabela 12 – Valores de significância estatística para schwannomas vs astrocitomas

**12. Apêndice XII – Valores de significância estatística para astrocitomas grau
 III vs grau IV**

| Ac | Diferenças significativas ($p < 0.05$) | Valor p | Diferenças não significativas ($p > 0.05$) | Valor p |
|-------------|--|---------|--|---------|
| GFAP | | | GFAP/C/N | 0,059 |
| | | | GFAP/C/ZT | 0,932 |
| | | | GFAP/C/T | 0,353 |
| | | | GFAP/N/comp | 0,113 |
| | | | GFAP/ZT/comp | 0,397 |
| | | | GFAP/T/comp | 0,235 |
| NeuN | NeuN/C/N | 0,000 | NeuN/N/N | 0,168 |
| | NeuN/C/ZT | 0,000 | NeuN/N/ZT | 0,163 |
| | NeuN/C/T | 0,007 | NeuN/N/T | 0,455 |
| | | | NeuN/N/comp | 0,226 |
| | | | NeuN/ZT/comp | 0,197 |
| | | | NeuN/T/comp | 0,624 |
| PGP | | | PGP/N/N | 0,961 |
| | | | PGP/N/ZT | 0,067 |
| | | | PGP/N/T | 0,104 |
| | | | PGP/C/N | 0,322 |
| | | | PGP/C/ZT | 0,341 |
| | | | PGP/C/T | 0,414 |
| | | | PGP/N/comp | 0,749 |
| | | | PGP/ZT/comp | 0,730 |
| | | | PGP/T/comp | 0,211 |

Tabela 15 – Valores de significância estatística para astrocitomas grau III vs grau IV

**13. Apêndice XIII – Valores de significância estatística para astrocitomas
 grau II vs grau III**

| Ac | Diferenças significativas (p<0.05) | Valor p | Diferenças não significativas (p>0.05) | Valor p |
|-------------|--|---------|--|---------|
| GFAP | | | GFAP/C/N | 0,793 |
| | | | GFAP/C/ZT | 1,000 |
| | | | GFAP/C/T | 0,522 |
| | | | GFAP/N/comp | 0,360 |
| | | | GFAP/ZT/comp | 0,721 |
| | | | GFAP/T/comp | 1,000 |
| NeuN | | | NeuN/N/N | 0,168 |
| | | | NeuN/N/ZT | 0,163 |
| | | | NeuN/N/T | 0,455 |
| | | | NeuN/C/N | 0,419 |
| | | | NeuN/C/ZT | 0,817 |
| | | | NeuN/C/T | 0,325 |
| | | | NeuN/N/comp | 0,528 |
| | | | NeuN/ZT/comp | 0,063 |
| | | | NeuN/T/comp | 0,660 |
| PGP | PGP/ZT/comp | 0,024 | PGP/N/N | 0,550 |
| | | | PGP/N/ZT | 0,424 |
| | | | PGP/N/T | 0,434 |
| | | | PGP/C/N | 0,393 |
| | | | PGP/C/ZT | 0,828 |
| | | | PGP/C/T | 0,396 |
| | | | PGP/N/comp | 0,966 |
| | | | PGP/T/comp | 0,429 |

Tabela 19 – Valores de significância estatística para astrocitomas grau II vs grau III

14. Apêndice XIV – Valores de significância estatística para controlos vs astrocitomas

| Ac's e zonas | Controlos vs astrocitomas grau I | Controlos vs astrocitomas grau II | Controlos vs astrocitomas grau III | Controlos vs astrocitomas grau IV |
|---------------------|---|--|---|--|
| GFAP/C/N | 0,052 | 0,028 | 0,024 | 0,136 |
| GFAP/C/ZT | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| GFAP/C/T | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| GFAP/N/comp | 0,001 | 0,409 | 0,764 | 0,022 |
| GFAP/T/comp | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| NeuN/N/N | 0,199 | 0,125 | 0,176 | 0,015 |
| NeuN/N/ZT | 0,002 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| NeuN/N/T | 0,012 | 0,000 | 0,001 | 0,000 |
| NeuN/C/N | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,280 |
| NeuN/N/comp | 0,392 | 0,027 | 0,056 | 0,852 |
| NeuN/T/comp | 0,853 | 0,684 | 0,983 | 0,478 |
| PGP/N/N | 0,481 | 0,246 | 0,119 | 0,128 |
| PGP/N/ZT | 0,043 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| PGP/N/T | 0,071 | 0,001 | 0,004 | 0,000 |
| PGP/C/N | 0,452 | 0,392 | 0,121 | 0,469 |
| PGP/C/ZT | 0,254 | 0,008 | 0,002 | 0,000 |
| PGP/C/T | 0,491 | 0,038 | 0,157 | 0,034 |
| PGP/N/comp | 0,000 | 0,004 | 0,017 | 0,031 |
| PGP/T/comp | 1,000 | 0,178 | 0,539 | 0,071 |

Tabela 21 – Valores de significância estatística para controlos vs astrocitomas

**15. Apêndice XV – Médias ponderadas das avaliações IHQs dos casos
 controlo**

| Ac's e zonas | Epilepsia | Metástases | Schwanomas |
|--------------------|-----------|------------|------------|
| GFAP/C/N | 4,000 | | 1,500 |
| GFAP/C/ZT | | | 1,500 |
| GFAP/C/T | | 0,000 | 1,500 |
| GFAP/N/comp | 2,000 | | |
| GFAP/T/comp | | 0,100 | 0,600 |
| NeuN/N/N | 3,950 | | 0,000 |
| NeuN/N/ZT | | | 0,000 |
| NeuN/N/T | | 0,000 | 0,000 |
| NeuN/C/N | 3,800 | | |
| NeuN/N/comp | 1,900 | | |
| NeuN/T/comp | | 0,500 | 0,000 |
| PGP/N/N | 3,350 | | 0,450 |
| PGP/N/ZT | | | 0,450 |
| PGP/N/T | | 0,650 | 0,450 |
| PGP/C/N | 4,000 | | 1,350 |
| PGP/C/ZT | | | 1,350 |
| PGP/C/T | | 1,200 | 1,350 |
| PGP/N/comp | 3,800 | | |
| PGP/T/comp | | 0,300 | 0,700 |

Tabela 22 - Médias ponderadas das avaliações IHQs dos controlos.

IX. Referências Bibliográficas

1. Day I, Thompson R. (2010). UCHL1 (PGP 9.5): Neuronal biomarker and ubiquitin system protein. *Progress in Neurobiology*, 90, 327–362.
2. Bassotti G, *et al.* (2005). Interstitial cells of Cajal, enteric nerves, and glial cells in colonic diverticular disease. *J Clin Pathol*, 58(9), 973-7.
3. Thompson RJ, Doran JF, Jackson P, Dhillon AP, Rode J (1983). PGP 9.5, a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res*, 278(1-2), 224-8.
4. Anderson, N.G., Anderson, N.L. (1979). *Molecular Anatomy*, vol. 63. Behring Inst Mitt, pp. 169–210.
5. Jackson, P., Thompson, R.J. (1981). The demonstration of new human brain-specific proteins by high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of the Neurological Sciences*, 49, 429–438.
6. Mayer, A.N., Wilkinson, K.D. (1989). Detection, resolution, and nomenclature of multiple ubiquitin carboxyl-terminal esterases from bovine calf thymus. *Biochemistry*, 28, 166–172.
7. Campbell LK, *et al.* (2003). Protein Gene Product (PGP 9.5) is not a specific marker of neural and nerve sheath tumours: an immunohistochemical study of 95 mesenchymal neoplasms. *Mod Pathol*, 16(10), 963-9.
8. Osaka, Hitoshi, Wang, Yu-Lai, Takada, Koji, Takizawa, Shuichi, Setsuie, Rieko, Li, Hang, Sato, Yae, *et al.* (2003). Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Human Molecular Genetics*, 12, 1945–1958.
9. Liu, Yichin, Fallon, Lara, Lashuel, Hilal A., Liu, Zhihua, Lansbury, Peter T. (2002). The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect

- alphasynuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell*, 111, 209–218.
10. Shimshek D, Schweizer T, Schmid P, Van der Putten P (2012). Excess α -synuclein worsens disease in mice lacking ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1. *Sci Rep.*, 2, 262.
11. Namdori R *et al.* (2012). Essential Role of Ubiquitin C-terminal Hydrolases UCHL1 and UCHL3 in Mammalian Oocyte Maturation. *J. Cell. Physiol*, 227, 2022–2029.
12. Wobst *et al.* (2012). UCHL1 regulates ubiquitination and recycling of the neural cell adhesion molecule NCAM. *FEBS Journal*, 279, 4398–4409.
13. Lewis S *et al.* (2010). Identification and Preliminary Characterization of Ubiquitin C Terminal Hydrolase 1 (UCHL1) as a Biomarker of Neuronal Loss in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Journal of Neuroscience Research*, 88, 1475–1484.
14. Blyth BJ, Farahvar A, He H, Nayak A, Yang C, Shaw G, Bazarian JJ. (2011). Elevated serum ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 is associated with abnormal blood-brain barrier function after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 28(12), 2453-62.
15. Bassères E, Coppotelli G, Pfirrmann T, Andersen JB, Masucci M, Frisan T. (2010). The ubiquitin C-terminal hydrolase UCH-L1 promotes bacterial invasion by altering the dynamics of the actin cytoskeleton. *Cellular Microbiology*, 12(11), 1622–1633.
16. Hussain S, Feldman AL, Das C, Ziesmer SC, Ansell SM, Galardy PJ. (2013). Ubiquitin Hydrolase UCH-L1 Destabilizes mTOR Complex 1 by Antagonizing DDB1-CUL4-Mediated Ubiquitination of Raptor. *Molecular and Cellular Biology*, 33(6), 1188–1197.

17. Malvasi A *et al.* (2013). NT, NPY and PGP 9.5 presence in myometrium and in fibroid pseudocapsule and their possible impact on muscular physiology. *Gynecol Endocrinol*, 29(2), 177-81.
18. Zetterberg M *et al.* (2010). Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCHL1) S18Y polymorphism in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 5:11, doi: 10.1186/1750-1326-5-11.
19. Bilguvara K *et al.* (2013). Recessive loss of function of the neuronal ubiquitin hydrolase UCHL1 leads to early-onset progressive neurodegeneration. *PNAS*, 110(9), 3489–3494.
20. Klein C and Westenberger A. (2012). Genetics of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2.
21. Miyake Y *et al.* (2012). UCHL1 S18Y variant is a risk factor for Parkinson's disease in Japan. *BMC Neurology*, 12:62, doi: 10.1186/1471-2377-12-62.
22. Jara JH, Frank DD, Özdinler PH. (2013). Could Dysregulation of UPS be a Common Underlying Mechanism for Cancer and Neurodegeneration? Lessons from UCHL1. *Cell Biochem Biophys*, 67(1), 45-53.
23. Mitsui Y *et al.* (2012). Tumor Suppressor Function of PGP9.5 Is Associated with Epigenetic Regulation in Prostate Cancer—Novel Predictor of Biochemical Recurrence after Radical Surgery. *American Association for Cancer Research*, 21, 487-496.
24. Sato N, Fukushima N, Maitra A, Matsubayashi H, Yeo CJ, Cameron JL, *et al.* (2003). Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer Res*, 63, 3735–42.

25. Mandelker DL, Yamashita K, Tokumaru Y, Mimori K, Howard DL, Tanaka Y, *et al.* (2005). PGP9.5 promotor methylation is an independent prognostic factor for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 65, 4963–8.
26. Yamashita K, Park HL, Kim MS, Osada M, Tokumaru Y, Inoue H, *et al.* (2006). PGP9.5 methylation in diffuse-type gastric cancer. *Cancer Res*, 66, 3921–7.
27. Tokumaru Y, Yamashita K, Kim MS, Park HL, Osada M, Mori M, *et al.* (2008). The role of PGP9.5 as a tumor suppressor gene in human cancer. *Int J Cancer*, 123, 753–9.
28. The Japanese Urological Association and the Japanese Society of Pathology (1992) *General rules for clinical and pathological studies on prostate cancer*. 2nd edition. Tokyo, Japan, Kanahara-Shuppan.
29. Gleason DF, and the Veteran's Administration Cooperative Urological Research Group (1977) *Histological grading and clinical staging of prostatic carcinoma*. Philadelphia, PA, Lea & Febiger.
30. Shigeno K, Igawa M, Shiina H, Wada H, Yoneda T. (2000). Doppler ultrasonography in detecting prostate cancer. *BJU*, 86, 229–33.
31. Dahiya R, Lee C, McCarville J, Hu W, Kaur G, Deng G. (1997). High frequency of genetic instability of microsatellites in human prostatic adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 72, 762–7.
32. Ummanni R *et al.* (2011). Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UCHL1) is a potential tumour suppressor in prostate cancer and is frequently silenced by promoter methylation. *Molecular Cancer*, 10:129, doi: 10.1186/1476-4598-10-129.
33. Lee YM, Lee JY, Kim MJ, Bae HI, Park JY, Kim SG, Kim DS. (2006). Hypomethylation of the protein gene product 9.5 promoter region in gallbladder

- cancer and its relationship with clinicopathological features. *Cancer Sci*, 97, 1205-1210.
34. Sato F, Meltzer SJ. (2006). CpG island hypermethylation in progression of esophageal and gastric cancer. *Cancer*, 106, 483-493.
35. Kumagai T, Akagi T, Desmond JC, Kawamata N, Gery S, Imai Y, Song JH, Gui D, Said J, Koeffler HP. (2009). Epigenetic regulation and molecular characterization of C/EBPalpha in pancreatic cancer cells. *Int J Cancer*, 124, 827-833.
36. Kim HJ, Kim YM, Lim S, Nam YK, Jeong J, Kim HJ, Lee KJ. (2009). Ubiquitin Cterminal hydrolase-L1 is a key regulator of tumor cell invasion and metastasis. *Oncogene*, 28, 117-127.
37. Bheda A, Yue W, Gullapalli A, Whitehurst C, Liu R, Pagano JS, Shackelford J. (2009). Positive reciprocal regulation of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 and beta-catenin/TCF signaling. *PLoS One*, 4(6), doi: 10.1371/journal.pone.0005955.
38. Zhong J *et al.* (2012). UCHL1 acts as a colorectal cancer oncogene via activation of the β -catenin/TCF pathway through its deubiquitinating activity. *International Journal of Molecular Medicine*, 30, 430-436.
39. Bonazzi VF, Nancarrow DJ, Stark MS, Moser RJ, Boyle GM, Aoude LG, Schmidt C, Hayward NK. (2011). Cross-Platform Array Screening Identifies COL1A2, THBS1, TNFRSF10D and UCHL1 as Genes Frequently Silenced by Methylation in Melanoma. *PLoS ONE*, 6(10), doi: 10.1371/journal.pone.0026121.
40. Wulfanger J *et al.* (2013). Heterogeneous expression and functional relevance of the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 in melanoma. *Int. J. Cancer*, 133(11), 2522-32.

41. Kabuta T *et al.* (2013). Ubiquitin C-terminal Hydrolase L1 (UCH-L1) Acts as a Novel Potentiator of Cyclin-dependent Kinases to Enhance Cell Proliferation Independently of Its Hydrolase Activity. *J. Biol. Chem.*, 288, 12615-12626.
42. Li L, Tao Q, Jin H, van HA, Poon FF, Wang X, Zeng MS, Jia WH, Zeng YX, Chan AT, *et al.* (2010). The tumor suppressor UCHL1 forms a complex with p53/MDM2/ARF to promote p53 signaling and is frequently silenced in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 16, 2949-2958.
43. Yang WJ, Guo MZ, Yang YS. (2012). The role of hypermethylation in promoter region of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 in human esophageal cancer. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 51(5), 390-3.
44. Norihiro Kato, Hiroyuki Yamamoto, Yasushi Adachi, Hirokazu Ohashi, Hiroaki Taniguchi, Hiromu Suzuki, Mayumi Nakazawa, Hiroyuki Kaneto, Shigeru Sasaki, Kohzoh Imai, Yasuhisa Shinomura. (2013). Cancer detection by ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 methylation in pancreatobiliary fluids. *World J Gastroenterol*, 19(11), 1718-1727.
45. Yu J, Tao Q, Cheung KF, Jin H, Poon FF, Wang X, Li H, Cheng YY, Rocken C, Ebert MP, Chan AT, Sung JJ. (2008). Epigenetic identification of ubiquitin carboxylterminal hydrolase L1 as a functional tumor suppressor and biomarker for hepatocellular carcinoma and other digestive tumors. *Hepatology*, 48: 508–18.
46. Dako. PGP 9.5. Recuperado a 2 de Março de 2012, de http://www.dako.com/dist/ar38/p105620/prod_products.htm.
47. Shimada S *et al.* (2007). Nestin expression as a new marker in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Pathology international*, 57, 60-67.

48. Jackson, P., Elfman, L., Torrance, M.R., Thompson, R.J. (1984). Identification of nervous-system-specific PGP 9.5 in human neuroblastoma and astrocytoma cell lines using immunoblotting of fixed and stained two-dimensional polyacrylamide gels. Neuhoff, V. (Ed.), *Electrophoresis '84*. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 293–296.
49. Giambanco I, Bianchi R, Ceccarelli P *et al.* (1991). "Neuron-specific" protein gene product 9.5 (PGP 9.5) is also expressed in glioma cell lines and its expression depends on the cellular growth state". *FEBS Letters*, 290, 131-134.
50. J W Ironside, T H Moss, D N Louis, J S Lowe, R O Weller. (2002). *Diagnostic Pathology of Nervous System Tumours*. 1st edition. Churchill Livingstone.
51. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. (2013). *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 9th Edition, Elsevier Saunders.
52. Zhu Y, Parada LF. (2002). The molecular and Genetic of Neurological Tumours. *Nature Reviews Cancer*, 2, 616-626.
53. Barres B. (2008). The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. *Neuron*, 60, 430-440.
54. Sofroniew MV, Vinters HV. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119(1), 7-35.
55. World Health Organization, International Agency for research on Cancer. Cancer Mondial, recuperado a 20 de Janeiro de 2014, de <http://www-dep.iarc.fr>.
56. Cancer Research UK. Brain, other CNS and intracranial tumours incidence statistics. Recuperado a 20 de Janeiro de 2014, de <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/types/brain/incidence/uk-brain-and-central-nervous-system-cancer-incidence-statistics>.

57. Schmidt LS, Schmiegelow K, Lahteenmaki P, Träger C, Stokland T, Grell K, Gustafson G, Sehested A, Raashou-Nielsen O, Johansen C, Schüz J. (2011). Incidence of childhood central nervous system tumors in the Nordic countries. *Pediatr Blood Cancer*, 56(1), 65-9.
58. Beygi S, Saadat S, Jazayeri SB, Rahimi-Movaghar V. (2013). Epidemiology of pediatric primary malignant central nervous system tumors in Iran: A 10 year report of National Cancer Registry. *Cancer Epidemiology*, 37(4), 396–401.
59. American Cancer Society. What are the key statistics about brain and spinal cord tumors? Recuperado a 20 de Janeiro de 2014, de <http://www.cancer.org/cancer/braincnstumorsinadults/detailedguide/brain-and-spinal-cord-tumors-in-adults-key-statistics>.
60. Weinberg RA. (2007). The biology of Cancer. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
61. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. (2007). WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. WHO Press.
62. Mullen R, Buck C, Smith A. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116, 201-211.
63. Kim K, Adelstein R, Kawamoto S. (2009). Identification of Neuronal Nuclei (NeuN) as Fox-3, a New Member of the Fox-1 Gene Family of Splicing Factors. *J Biol Chem*, 284(45), 31052–31061.
64. Weyer A, Schilling K. (2003). Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res*. 73(3), 400-409.
65. UniProt Consortium. P14136 (GFAP_HUMAN). Recuperado a 9 de Julho de 2012 de <http://www.uniprot.org/uniprot/P14136#ref3>.

66. Dako. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP). Recuperado a 9 de Julho de 2012 de http://www.dako.com/dist/ar38/p104410/prod_products.htm.
67. Ventana. GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein). Recuperado a 9 de Julho de 2012, de <http://www.ventana.com/product/92?type=87>.
68. Fisher CJ, Gillett CE, Vojtěšek B, Barnes DM & Millis RR. (1994). Problems with p53 immunohistochemistry staining: the effect of fixation and variation in the methods of evaluation. *Br. J. Cancer*, 69, 26-31.
69. Memoli VA, Brown EF, Gould VE. (1984). Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in peripheral nerve sheath tumors. *Ultrastruct Pathol*, 7, 269–275.
70. Gould VE, Moll R, Moll I, *et al.* (1986) The intermediate filament complement of the spectrum of nerve sheath neoplasms. *Lab Invest*, 55, 463–474.
71. Kawahara E, Oda Y, Ooi A, *et al.* (1988). Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in peripheral nerve sheath tumors. *Am J Surg Pathol*, 12, 115–120.
72. Gray MH, Rosenberg AE, Dickersin GR, *et al.* (1989) Glial fibrillary acidic protein and keratin expression by benign and malignant nerve sheath tumors. *Hum Pathol*, 20, 1089–1096.
73. Fanburg-Smith JC, Majidi M, Miettinen M. (2006). Keratin expression in schwannoma; a study of 115 retroperitoneal and 22 peripheral Schwannomas. *Modern Pathology*, 19, 115–121.
74. Triolo D, Dina G, Lorenzetti I, Malaguti M, Morana P, Del Carro U, Comi G, Messing A, Quattrini A, Previtali S. (2006) Loss of glial fibrillary acidic protein (GFAP) impairs Schwann cell proliferation and delays nerve regeneration after damage. *Journal of Cell Science*, 119, 3981-3993.

75. Jessen KR, Morgan L, Stewart HJ and Mirsky R. (1990). Three markers of adult non-myelin-forming Schwann cells, 217c(Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions. *Development*, 109, 91-103.
76. Mirsky R and Jessen KR. (2005). Molecular signaling in Schwann cell development. In *Peripheral Neuropathy*. Vol. 1 (ed. P. J. Dyck and P. K. Thomas), pp. 341-376. Philadelphia: Elsevier Saunders.
77. Gullotta F, Schindler F, Schmutzler R, Weeks-Seifert A. (1985). GFAP in Brain Tumor Diagnosis: Possibilities and Limitations. *Pathology - Research and Practice*, 180, 1, 54–60.
78. Herpers MJ, Ramaekers FC, Aldeweireldt J, Moesker O, Slooff J. (1986). Co-expression of glial fibrillary acidic protein- and vimentin-type intermediate filaments in human astrocytomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, 70, 333–9.
79. Blechingberg J, Holm IE, Nielsen KB, Jensen TH, Jorgensen AL, Nielsen AL. (2007). Identification and characterization of GFAPkappa, a novel glial fibrillary acidic protein isoform. *Glia*, 55, 497–507.
80. Lyubimova NV, Toms MG, Fu RG, Bondarenko YV. (2013). Biochemical markers of brain tumours. *Klin Lab Diagn*, 10, 71-2, 40-2.
81. Jung CS, Foerch C, Schänzer A, Heck A, Plate KH, Seifert V, Steinmetz H, Raabe A and Sitzer M. (2007). Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain*, 130, 3336-3341.
82. Zhu J, Wang H, Fan Y, Hu Y, Ji X, Sun Q, Liu H. (2014). Knockdown of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 by lentivirus induces differentiation of glioma stem-like cells. *Oncol Rep*. doi: 10.3892/or.2014.3320.

83. Bonnin JM, Rubinstein LJ. (1984). Immunohistochemistry of central nervous system tumors. Its contributions to neurosurgical diagnosis. *J Neurosurg*, 60(6), 1121-33.
84. D'Amico AG, Castorina A, Leggio GM, Drago F, D'Agata V. (2013). Hippocampal neurofibromin and amyloid precursor protein expression in dopamine D (3) receptor knock-out mice following passive avoidance conditioning. *Neurochem Res*, 38, 564–572.
85. Dahlstrand J, Collins VP, Lendahl U. (1992). Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res*, 52, 5334–5341.
86. Tohyama T, Lee VM, Rorke LB, Marvin M, McKay RD, Trojanowski JQ. (1992). Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells. *Lab Invest*, 66, 303–313.
87. Rutka JT, Murakami M, Dirks PB, Hubbard SL, Becker LE, Fukuyama K, Jung S, Tsugu A, Matsuzawa K. (1997). Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. *J Neurosurg*, 87(3), 420-30.
88. Sampath P, Weaver CE, Sungarian A, Cortez S, Alderson L, Stopa EG. (2004). Cerebrospinal fluid (vascular endothelial growth factor) and serologic (recoverin) tumor markers for malignant glioma. *Cancer Control*, 11, 174–180.
89. Chumbalkar VC, Subhashini C, Dhople VM, Sundaram CS, Jagannadham MV, Kumar KN, *et al.* (2005). Differential protein expression in human gliomas and molecular insights. *Proteomics*, 5, 1167–77.
90. Jacque CM, Vinner C, Kujas M, Raoul M, Racadot J, Baumann NA. (1978). Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. *J Neurol Sci*, 35(1), 147-55.

91. Murphy KG, Hatton JD, U HS. (1998). Role of glial fibrillary acidic protein expression in the biology of human glioblastoma U-373MG cells. *J Neurosurg*, 89(6), 997-1006.
92. Zhou R, Skalli O. (2000). TGF- α differentially regulates GFAP, vimentin, and nestin gene expression in U-373 MG glioblastoma cells: correlation with cell shape and motility. *Exp Cell Res*, 254, 269–78.
93. Lee K, Jeon K, Kim JM, Kim VN, Choi DH, Kim SU, Kim S. (2005). Downregulation of GFAP, TSP-1, and p53 in human glioblastoma cell line, U373MG, by IE1 protein from human cytomegalovirus. *Glia*, 51(1), 1-12.
94. Abaza MS, Shaban F, Narayan RK, Atassi MZ. (1998) Human glioma associated intermediate filament proteins: over-expression, co-localization and cross-reactivity. *Anticancer Res*, 18(2B), 1333-40.
95. Eddleston M, Mucke L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes—implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, 54, 15–36.
96. Kreutzberg GW. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19, 312–318.
97. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW. (1993). Cytotoxicity of microglia. *Glia*, 7, 111–118.
98. Hewett SJ, Csernansky CA, Choi DW. (1994). Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron*, 13, 487–494.
99. Bolanos JP, Almeida A, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clark JB, Heals SJR. (1997). Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem*, 68, 2227–2240.

100. Chao CC. (1996). Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a NO mechanism. *Glia*, 16, 276–284.
101. Hu J, Ferreira A, Van Eldik LJ. (1997). S100 beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem*, 69, 2294–2301.
102. Kingham PJ, Cuzner ML, Pocock JM. (1999). Apoptotic pathways mobilized in microglia and neurons as a consequence of chromogranin A-induced microglial activation. *J Neurochem*, 73, 538–547.
103. Tanabe K, Akanishi H, Maeda H, Nishioku T, Hashimoto K, Liou SY, Akamines A, Yamamoto K. (1999). A predominant apoptotic death pathway of neuronal PC12 cells induced by activated microglia is displaced by a non-apoptotic death pathway following blockage of caspase-3-dependent cascade. *J Biol Chem*, 274, 15725–15731.
104. Bal-Price A and Brown GC. (2001). Inflammatory Neurodegeneration Mediated by Nitric Oxide from Activated Glia-Inhibiting Neuronal Respiration, Causing Glutamate Release and Excitotoxicity. *The Journal of Neuroscience*, 21(17), 6480–6491.
105. Loihl AK, Murphy S. (1998). Expression of NOS-2 in glia associated with CNS pathology. *Prog Brain Res*, 118, 253–267.
106. Bolanos JP, Almeida A. (1999). Role of nitric oxide in brain hypoxia ischaemia. *Biochim Biophys Acta*, 1411, 415–436.
107. Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S. (1999). Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med*. 5, 1403–1409.

108. Gambuzza ME, Sofo V, Salmeri FM, Soraci L, Marinoc S, Bramanti P. (2014) Toll-Like Receptors in Alzheimer's Disease: a Therapeutic Perspective. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2014 Aug 6.
109. Chechlinska M, Kowalewska M, Nowak R. (2010) Systemic inflammation as a confounding factor in cancer biomarker discovery and validation. *Nat Rev Cancer*, 10(1), 2-3.
110. Issazadeh-Navikas S. (2013). Alerting the immune system via stromal cells is central to the prevention of tumor growth. *Oncoimmunology*, 2(12).
111. Carmi Y, Dotan S, Rider P, Kaplanov I, White MR, *et al.* (2013). The role of IL-1beta in the early tumor cell-induced angiogenic response. *J Immunol*, 190, 3500–3509.
112. Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. (2012). Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nat Immunol*, 13, 343–351.
113. Dunn JH, Ellis LZ, Fujita M. (2012). Inflammasomes as molecular mediators of inflammation and cancer: potential role in melanoma. *Cancer Lett*, 314, 24–33.
114. Dinarello CA. (2010). Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade? *Cancer Metastasis Rev*, 29, 317–329.
115. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. (2011). The brain tumor microenvironment. *Glia*, 59, 1169–1180.
116. Cooper LA, Gutman DA, Chisolm C, Appin C, Kong J, *et al.* (2012). The tumor microenvironment strongly impacts master transcriptional regulators and gene expression class of glioblastoma. *Am J Pathol*, 180, 2108–2119.
117. Liu Y, Teige I, Birnir B, Issazadeh-Navikas S. (2006). Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. *Nat Med*, 12, 518-25.

118. Liu Y, Carlsson R, Ambjørn M, Hasan M, Badn W, Darabi A, Siesjö P, Issazadeh-Navikas S. (2013). PD-L1 expression by neurons nearby tumors indicates better prognosis in glioblastoma patients. *J Neurosci*, 33, 14231-45.
119. Le DM, Besson A, Fogg DK, Choi KS, Waisman DM, Goodyer CG, Rewcastle B, Yong VW. (2003). Exploitation of astrocytes by glioma cells to facilitate invasiveness: a mechanism involving matrix metalloproteinase- 2 and the urokinase-type plasminogen activator-plasmin cascade. *J Neurosci*, 23, 4034–4043.